

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



## TESIS DOCTORAL

**Detección de *Alternaria* spp mediante técnicas genéticas  
como índice de calidad de materias primas y marcador de  
bioseguridad en productos hortofrutícolas frescos y  
procesados**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Miguel Ángel Pavón Moreno

Directoras

Teresa García Lacarra  
M<sup>a</sup> del Rosario Martín de Santos  
M<sup>a</sup> Isabel González Alonso

Madrid, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**DETECCIÓN DE *ALTERNARIA* SPP. MEDIANTE TÉCNICAS  
GENÉTICAS COMO ÍNDICE DE CALIDAD DE MATERIAS  
PRIMAS Y MARCADOR DE BIOSEGURIDAD EN  
PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS FRESCOS Y  
PROCESADOS**

**TESIS DOCTORAL**

**MIGUEL ÁNGEL PAVÓN MORENO**

**Madrid, 2012**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**DETECCIÓN DE *ALTERNARIA* SPP. MEDIANTE TÉCNICAS  
GENÉTICAS COMO ÍNDICE DE CALIDAD DE MATERIAS  
PRIMAS Y MARCADOR DE BIOSEGURIDAD EN  
PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS FRESCOS Y  
PROCESADOS**

Memoria que, para optar al título de Doctor con mención honorífica de “Doctorado Europeo”, presenta el Licenciado

Miguel Ángel Pavón Moreno







DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA  
DE LOS ALIMENTOS

FACULTAD DE VETERINARIA

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid

Teléfono: 91 394 37 50. Fax: 91 394 37 43

**TERESA GARCÍA LACARRA (*Profesora Titular de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos*), M<sup>a</sup> DEL ROSARIO MARTÍN DE SANTOS (*Catedrática de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos*) y M<sup>a</sup> ISABEL GONZÁLEZ ALONSO (*Profesora Titular de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos*),**

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Detección de *Alternaria* spp. mediante técnicas genéticas como índice de calidad de materias primas y marcador de bioseguridad en productos hortofrutícolas frescos y procesados”, de la que es autor el Licenciado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos D. Miguel Ángel Pavón Moreno, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de las que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor con mención honorífica de “Doctorado Europeo”.

Madrid, 18 de septiembre de 2012

Fdo: Teresa García Lacarra

Fdo: M<sup>a</sup> Rosario Martín de Santos

Fdo: M<sup>a</sup> Isabel González Alonso



***A mis padres y hermano***

***A Sonia***

***En memoria de mis abuelos***



## AGRADECIMIENTOS

Desde estas líneas quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a todas y cada una de las personas que han contribuido directa o indirectamente en la realización de esta tesis doctoral, porque sin su ayuda y apoyo la realización de este trabajo no hubiera sido posible.

En primer lugar quisiera dar las gracias a mis directoras de tesis, Teresa García Lacarra, Rosario Martín de Santos e Isabel González Alonso. Teresa, muchas gracias por todo el apoyo y la confianza depositada en mí durante estos años, así como por tu ayuda en el laboratorio con las largas fusiones celulares, la siembra de mohos, etc. Tu guía, críticas y supervisión han sido fundamentales para la realización de este trabajo. Charo, muchas gracias por haber confiado en mí desde el primer momento, y por la ayuda y los consejos que me has prestado durante la elaboración de esta tesis. Isabel, muchas gracias por tus muestras de interés y apoyo, siempre que he necesitado tu ayuda has dejado lo que estabas haciendo para ofrecérmela. A las tres muchas gracias por vuestros ánimos y charlas que hemos tenido durante estos años, que siempre son necesarias en momentos de desánimo para seguir adelante.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la financiación del Proyecto AGL2006-07659/ALI y a la Comunidad Autónoma de Madrid por la concesión del Programa de Vigilancia Sanitaria S-2009/AGR/1489. Asimismo, agradezco al Ministerio de Educación y Ciencia la beca recibida dentro del Plan de Formación de Profesorado Universitario.

A Lorenzo de la Hoz Perales (†), Director del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid cuando empecé mi tesis doctoral, por darme la oportunidad de realizarla en este Departamento, y a la actual Directora, M<sup>a</sup> Dolores Selgas Cortecero, por su ayuda en la tramitación de esta tesis.

Por supuesto, quiero dar las gracias a todos los profesores del Departamento, especialmente a Pablo Hernández y Juan Miguel Rodríguez por su preocupación y por tener esas agradables charlas en los pasillos. A María Marín por aguantar con paciencia cada vez que entraba en el despacho para aclarar dudas y hacer preguntas a Teresa. También agradecer al personal del Departamento, Aurora y Alberto, por su ayuda durante estos años. Y por supuesto a Santiago y Rosi, por su ayuda inestimable, y cómo no, por las conversaciones y bromas mañaneras, muy buenas para empezar la mañana con energía.

Al Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Técnica de Dinamarca, por permitirme disfrutar de una estancia de tres meses en su centro. En especial a Birgitte Andersen y Ulf Thrane por sus enseñanzas en el laboratorio.

Naturalmente, no podía faltar un apartado en estos agradecimientos para mis compañeros de laboratorio y, por supuesto, amigos, vuestra amistad y complicidad han hecho que estos años sean inolvidables para mí. En primer lugar a María, mi gran amiga y compañera, aunque no

lo creas, no se qué decirte, porque son tantos los momentos que hemos vivido juntos que me faltan las palabras para expresarte mi gratitud. Muchas gracias por tus ánimos y alegría, siempre acabábamos el día con risas y carcajadas, aunque los experimentos no saliesen todo lo bien que deseábamos. Espero seguir disfrutando de esas risas durante mucho tiempo. Nicolette, tu apoyo constante y tus ánimos han sido indispensables para poder finalizar la tesis. Gracias por hacer más llevaderos los lunes, siempre teníamos algún suceso que contarnos para echarnos unas risas ¡Ánimo que la siguiente eres tú! A Violeta y Almudena, aunque hemos estado menos tiempo juntos en el laboratorio, habéis sido excelentes compañeras y se que me llevo dos grandes amigas. Violeta, gracias por tu hospitalidad y apoyo desde el primer día que llegué al laboratorio. Gracias por tu ayuda y paciencia en los primeros meses y durante todo el tiempo que fuiste mi compañera de laboratorio. Almudena, muchas gracias por tu apoyo y consejos, siempre directos y al grano. Espero que tu esfuerzo y sacrificio se vean recompensados en tu nueva etapa. MUCHAS GRACIAS chicas, por cuidarme tan bien en estos años.

A Irene, muchas gracias por tus ánimos y apoyo durante el tiempo que hemos compartido en el laboratorio. A Belén, muchas gracias por tu ayuda desinteresada en “mis primeros pasos”. Aunque eran tus últimos momentos en el laboratorio, siempre sacabas tiempo para ayudarme. Eugenia, muchas gracias por tus ánimos y apoyo. Tu filosofía, “cuando deseas algo enérgicamente, al final se cumple” me ha enseñado a ser siempre optimista y que todo, antes o después, llega. A las últimas incorporaciones del grupo, Silvia e Inés. Silvia, muchas gracias por tu apoyo. Ánimo, que todo trabajo tiene su recompensa. A Inés, con la que he compartido el principio y el fin de esta tesis, muchas gracias por tus ánimos y simpatía. Siempre tendré alguien con quien compartir los cotilleos del mundo rosa.

Al grupo de “punto lab”: Juan, Loreto, Juanjo, Cristina, Estefanía, Carlos (mi socio) y Sara. Muchas gracias por regalarme vuestra amistad y compañerismo. Cuánto echaré de menos nuestras conversaciones, confidencias, complicidad, los momentos de la comida... A las “chicas de Juan Miguel”, especialmente a Esther, Rebeca, Marta, Virginia y Nivia, muchas gracias por vuestra simpatía y compañerismo. A los nuevos compañeros, en especial a Alicia, mucho ánimo que el tiempo pasa muy rápido.

A los compañeros con los que he compartido algún momento en el laboratorio: Nuria, Bea, Antonio B., Jorge, Daniela, Luis (†), Antonio M., Susana, Arantxa, Ruth, Irene, Marta, Agustín, Samuel... Muchas gracias por todos los buenos momentos vividos.

Muchas gracias a todos por vuestra paciencia y soportar en algún momento mis cánticos de otras décadas (Hombres G, Juan Pardo, Tino Casal...), que en muchas ocasiones os recordaban a las canciones que escuchaban vuestros padres y/o hermanos.

A mis amigos del pueblo, siempre os habéis preocupado de cómo estoy, escuchando mis problemas y agobios. Muchas gracias por vuestros ánimos y comprensión. A mis compañeros de la banda de música, muy importante para mí en los momentos de desánimo. A Israel Carrazoni,

una de las personas que me impulsaron a hacer el doctorado, aunque hemos estado distanciados, siempre has tenido tiempo para preocuparte de cómo me iba. Estoy seguro de que saldrás victorioso en la nueva etapa en la que te embarques.

A mis padres, por el enorme esfuerzo que han hecho a lo largo de los años para que yo pudiese llegar hasta aquí. Espero que no tengáis que volver a aguantar mis cabreos, agobios y ataques de pesimismo. A mi hermano y mi cuñada, gracias por vuestra preocupación durante estos años. A mis abuelas, tíos y primos, gracias por vuestros apoyos y ánimos, ¡por fin terminé! A mis abuelos, que ya no están, pero sé que donde quiera que estén estarán celebrando que su nieto ya es doctor. Gracias también a la familia de Sonia, a sus padres, hermanas y cuñados, por sus ánimos y apoyo, y a los sobrinos, que con su energía y alegría me han hecho reír y desconectar en cualquier momento.

Por último, a Sonia, que empecé la tesis siendo tu novio, y la termino siendo tu marido ¡Cómo pasa el tiempo! Tú has sufrido mis enfados, mis cambios repentinos de humor, mis llantos, mis momentos de desánimo, pero siempre has estado a mi lado. Nunca podré expresar todo lo que te debo y lo importante que eres para mí.

Gracias de corazón a todos los que involuntariamente he olvidado citar y que en mayor o menor medida me han acompañado durante la realización de esta tesis doctoral. Espero que sepáis perdonar mi despiste...





*“La ciencia tiene las raíces amargas, pero muy dulces los frutos”*

**Aristóteles**



*Índice*

---



<b>RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>
<b>I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR .....</b>	<b>19</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>25</b>
II.1. <i>ALTERNARIA</i> SPP.: MORFOLOGÍA Y ECOLOGÍA.....	27
II.2. <i>ALTERNARIA</i> SPP. COMO ALTERANTE DE CULTIVOS VEGETALES ANTES Y DESPUÉS DE LA RECOLECCIÓN .....	28
II.2.1. ALTERACIONES EN CÍTRICOS .....	30
II.2.2. ALTERACIONES EN ROSÁCEAS.....	30
II.2.3. ALTERACIONES EN ACEITUNAS .....	32
II.2.4. ALTERACIONES EN FRUTOS SECOS .....	32
II.2.5. ALTERACIONES EN LEGUMINOSAS .....	32
II.2.6. ALTERACIONES EN CEREALES .....	33
II.2.7. ALTERACIONES EN OLEAGINOSAS.....	33
II.2.8. ALTERACIONES EN APIÁCEAS.....	35
II.2.9. ALTERACIONES EN SOLANÁCEAS .....	35
II.2.10. ALTERACIONES EN CUCURBITÁCEAS .....	36
II.2.11. ALTERACIONES EN CRUCÍFERAS .....	36
II.2.12. ALTERACIONES EN OTROS CULTIVOS .....	37
II.3. MICOTOXINAS PRODUCIDAS POR EL GÉNERO <i>ALTERNARIA</i> .....	37
II.3.1. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LAS MICOTOXINAS DE <i>ALTERNARIA</i> SPP.....	40
II.3.2. TOXICIDAD DE LAS MICOTOXINAS PRODUCIDAS POR <i>ALTERNARIA</i> SPP. ....	41
II.3.3. PRESENCIA DE MICOTOXINAS DE <i>ALTERNARIA</i> SPP. EN ALIMENTOS Y PIENSOS .....	47
II.3.4. EXPOSICIÓN HUMANA A LAS MICOTOXINAS DE <i>ALTERNARIA</i> SPP.....	50
II.3.5. CONTROL Y PREVENCIÓN DE MICOTOXINAS EN ALIMENTOS.....	51
II.4. EL GÉNERO <i>ALTERNARIA</i> COMO AGENTE CAUSAL DE ENFERMEDADES HUMANAS.....	51
II.5. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE LAS MICOTOXINAS DE <i>ALTERNARIA</i> SPP. EN ALIMENTOS.....	54

II.5.1. MÉTODOS DE MUESTREO .....	54
II.5.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA .....	54
II.5.3. MÉTODOS DE DETECCIÓN.....	55
II.5.3.1. Técnicas inmunológicas.....	55
II.5.3.2. Técnicas cromatográficas.....	55
II.6. DETECCIÓN DE <i>ALTERNARIA</i> SPP. EN ALIMENTOS MEDIANTE TÉCNICAS FENOTÍPICAS.....	57
II.6.1. MÉTODOS DE CULTIVO Y AISLAMIENTO EN PLACA.....	57
II.6.2. DETECCIÓN DE METABOLITOS Y CONSTITUYENTES CELULARES.....	59
II.6.3. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	60
II.6.4. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS .....	60
II.6.5. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	61
II.7. DETECCIÓN DE <i>ALTERNARIA</i> SPP. EN ALIMENTOS MEDIANTE TÉCNICAS GENÉTICAS .....	61
II.7.1. SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN AMPLIFICADOS POR PCR (PCR-SECUENCIACIÓN).....	62
II.7.2. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DEL ADN AMPLIFICADO CON CEBADORES ARBITRARIOS (RAPD) .....	63
II.7.3. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE REGIONES AMPLIFICADAS POR PCR (PCR-RFLP).....	64
II.7.4. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP).....	64
II.7.5. PCR CON CEBADORES ESPECÍFICOS.....	65
II.7.6. PCR EN TIEMPO REAL.....	65
II.7.7. PCR CON TRANSCRIPTASA INVERSA (RT-PCR) .....	67
II.7.8. MICROARRAYS DE ADN .....	67
<b>III. RESULTS AND DISCUSSION (Published articles) .....</b>	<b>69</b>
III.1. DETECTION AND IDENTIFICATION OF <i>ALTERNARIA</i> SPP. IN FOODSTUFFS BY PCR TECHNIQUES .....	71
III.1.1. PCR USING GENUS-SPECIFIC AND GROUP-SPECIFIC PRIMERS.....	71

III.1.2. PCR USING GENUS-SPECIFIC PRIMERS.....	71
III.2. CORRELATION BETWEEN THE DETECTION OF <i>ALTERNARIA</i> SPP. BY PCR AND THE PRESENCE OF THEIR MYCOTOXINS IN TOMATO PRODUCTS.....	93
III.3. DETECTION AND CUANTIFICATION OF <i>ALTERNARIA</i> SPP. IN FOODSTUFFS BY REAL-TIME PCR TECHNIQUES .....	103
III.3.1. REAL-TIME PCR.....	103
III.3.2. REAL-TIME RT-PCR.....	103
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>123</b>
IV.1. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LAS CEPAS FÚNGICAS .....	125
IV.2. DESARROLLO DE TÉCNICAS GENÉTICAS DE PCR CON CEBADORES ESPECÍFICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE <i>ALTERNARIA</i> SPP.....	125
IV.3. RELACIÓN ENTRE LA DETECCIÓN DE ADN DE <i>ALTERNARIA</i> SPP. MEDIANTE UNA TÉCNICA DE PCR Y LA PRESENCIA DE MICOTOXINAS PRODUCIDAS POR ESTE GÉNERO EN TOMATE Y DERIVADOS .....	139
IV.4. DESARROLLO DE TÉCNICAS DE PCR Y RT-PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE <i>ALTERNARIA</i> SPP. EN PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS FRESCOS Y PROCESADOS.....	144
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>161</b>
<b>V. CONCLUSIONS .....</b>	<b>163</b>
<b>VI. TRABAJO FUTURO .....</b>	<b>165</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>173</b>
<b>VIII. GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>197</b>





*Resumen*

*Abstract*

---



La contaminación de alimentos con hongos filamentosos productores de toxinas tiene efectos negativos sobre la salud animal y humana, además de causar pérdidas millonarias en la industria agroalimentaria. Entre los mohos toxigénicos más frecuentemente encontrados en los alimentos predominan las especies pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria*. En el género *Alternaria* se incluyen numerosas especies patógenas y saprofitas ampliamente distribuidas en el suelo y la materia orgánica en descomposición. Como saprofito, *Alternaria* spp. persiste en forma de micelio durante los inviernos y, cuando las condiciones de humedad y temperatura son adecuadas, produce conidios que se diseminan con la ayuda del viento, agua, insectos, etc. Los conidios de *Alternaria* spp. que colonizan las plantas, germinan e infectan las hojas, tallos o frutos, donde provocan lesiones de diversa consideración según la intensidad de la infección, además de ocasionar alteraciones postcosecha en diversos cultivos vegetales. La alteración de frutas, hortalizas y otros cultivos por especies de *Alternaria* constituye un problema para el sector, porque el deterioro organoléptico ocasiona importantes pérdidas económicas. Pero además, implica una amenaza para la salud de los consumidores, debido a que diversas especies de este género producen micotoxinas, que permanecen activas en los alimentos procesados. Para evitar la presencia de micotoxinas de *Alternaria* spp. en los alimentos deben utilizarse medidas preventivas que minimicen la contaminación por especies toxigénicas o eviten su desarrollo. Además, la aplicación y evaluación de estas

medidas de control y prevención, requiere disponer de métodos rápidos para la detección precoz de *Alternaria* spp. que puedan aplicarse al control rutinario de materias primas y productos transformados en la industria alimentaria.

La enumeración e identificación de mohos en los alimentos se realiza habitualmente mediante la siembra de la muestra en placas de agar con medios de cultivo selectivos, seguida del aislamiento y análisis pormenorizado de sus características morfológicas y fisiológicas conforme a claves de identificación específicas (Ellis y Ellis, 1997; Samson y col., 2004). Sin embargo, este procedimiento es laborioso y lento, lo que dificulta su uso como técnica rutinaria de análisis. En la actualidad, las técnicas genéticas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituyen una de las alternativas más empleadas para llevar a cabo la detección e identificación de mohos toxigénicos presentes en los alimentos debido a su sensibilidad, rapidez y especificidad (Niessen, 2007).

Teniendo en cuenta estos aspectos, en esta tesis doctoral se han utilizado distintas técnicas genéticas de PCR (PCR con cebadores específicos, PCR en tiempo real y PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) en tiempo real) para la detección e identificación de *Alternaria* spp. Asimismo, se ha desarrollado una técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la detección de alternueno (ALT), alternariol (AOH) y alternariol monometil éter (AME) en productos hortofrutícolas frescos y procesados, con el fin de comprobar si las técnicas de PCR

desarrolladas se podrían utilizar como marcador indirecto de la presencia de micotoxinas producidas por *Alternaria* spp. en estos productos.

### **1. Desarrollo de técnicas de PCR con cebadores específicos de género para la detección de *Alternaria* spp. en alimentos**

La identificación de géneros fúngicos mediante técnicas genéticas exige una cuidadosa selección de los marcadores a utilizar. Para el desarrollo de técnicas de PCR con cebadores específicos se eligieron como marcadores genéticos el espaciador interno de la transcripción (ITS) del ADN ribosómico y el gen nuclear *Alt a 1*, que codifica el principal alérgeno de *A. alternata* (*Alt a 1*) y de otras especies de este género. En el caso del marcador ITS, el estudio informático de las secuencias disponibles en las bases de datos para diferentes especies de *Alternaria* permitió el diseño de los cebadores Dir1ITSAlt/Inv1ITSAlt. Con relación al ensayo basado en gen nuclear *Alt a 1*, se diseñaron los cebadores Dir3Alta1/Inv4Alta1. Estas parejas de cebadores amplificaron fragmentos de aproximadamente 370 y 350 pares de bases (pb) en el ITS y el gen *Alt a 1*, respectivamente, a partir del ADN de todas las especies de *Alternaria* analizadas, no originando bandas de amplificación a partir del ADN de otras especies fúngicas, levaduras, bacterias, animales y plantas. La utilización de marcadores genéticos de una sola copia, como es el gen *Alt a 1*, puede representar un inconveniente para el análisis de muestras tratadas térmicamente, debido a la posible degradación del ADN de *Alternaria* spp. durante el procesado. Por este motivo, para

aumentar la eficiencia de la técnica desarrollada se diseñó un nuevo cebador, Dir5cAlta1, que combinado con el Inv4Alta1, delimita un fragmento de 195 pb en el ADN de las especies de *Alternaria*. La información contenida en las secuencias nucleotídicas amplificadas con las parejas de cebadores Dir1ITSAlt/Inv1ITSAlt y Dir3Alta1/Inv4Alta1, facilitó la elaboración de árboles filogenéticos que permitieron diferenciar cuatro grupos de especies de *Alternaria*: *A. alternata*, *A. porri*, *A. infectoria* y *A. radicina*.

En las técnicas de PCR, la presencia de sustancias inhibitoras en las muestras a analizar puede disminuir o incluso impedir por completo la amplificación del ADN. Para evitar una incorrecta interpretación de aquellos resultados de ausencia de amplificación que puedan deberse a fenómenos de inhibición, se utilizó un control positivo de amplificación mediante la técnica de PCR múltiple, incorporando junto con las parejas de cebadores específicos del género *Alternaria* los cebadores conservados 18SFwEu/18SRvEu, diseñados por Martín y col. (2009) a partir de secuencias del gen nuclear 18S ARNr. Estos cebadores amplificaron un fragmento 99 pb en todos los organismos eucariotas analizados.

El límite de detección de las técnicas de PCR con cebadores específicos (Dir1ITSAlt e Inv1ITSAlt y Dir5cAlta1 e Inv4Alta1) se determinó mediante la amplificación del ADN obtenido a partir de diluciones decimales de cultivos viables de *A. alternata*, *A. radicina*, *A. porri* y *A. infectoria* y los mismos cultivos sometidos a tratamientos térmicos de 60 °C durante 30 min y 90 °C

durante 5 min. La influencia de una matriz vegetal en la sensibilidad de la técnica de PCR para detectar *Alternaria* spp. se comprobó mediante el análisis de muestras de pulpa de tomate inoculadas con diluciones de cada uno de los cultivos viables e inactivados por calor. El límite de detección fue de  $10^2$  UFC/mL, tanto en los cultivos de *Alternaria* spp., como en pulpa de tomate, y no se vio afectado por los tratamientos térmicos empleados.

La aplicabilidad de las técnicas de PCR desarrolladas se determinó mediante el análisis de 48 muestras comerciales de tomate fresco y procesado y 11 muestras de papillas de cereales. Los cebadores específicos diseñados produjeron la amplificación de ADN de *Alternaria* spp. en 10 de las 59 muestras analizadas (17 %), correspondientes a 4 papillas de cereales, 3 tomates alterados, 2 tomates desecados y una salsa de tomate. Sin embargo, en todas las muestras analizadas se obtuvo amplificación con la pareja de cebadores empleada como control positivo, lo que demuestra que los resultados negativos con los cebadores específicos no se deben a la presencia de inhibidores o a la degradación del ADN, sino a la ausencia de ADN de *Alternaria* spp. La presencia de mohos y levaduras viables en las muestras se determinó mediante la siembra en Sabouraud-Cloranfenicol (Sabouraud-CAF), obteniéndose recuentos de  $10^3$  UFC/g en todas las muestras de tomate alterado analizadas y recuentos de  $10^2$  UFC/g a partir de las muestras de tomate desecado positivas por PCR. El resto de muestras de tomate fresco y procesado, así como las muestras de papillas de cereales, produjeron resultados nega-

tivos en el recuento de mohos en Sabouraud-CAF. El análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas obtenidas del ADN de las muestras positivas permitió agrupar las secuencias obtenidas a partir de las seis muestras de tomate fresco y procesado con las de especies pertenecientes al grupo de *A. alternata*, mientras que las secuencias obtenidas a partir de las muestras positivas de papillas de cereales se agruparon junto con las de las especies pertenecientes al grupo de *A. infectoria*.

## 2. Desarrollo de una técnica de PCR para la diferenciación de grupos de especies del género *Alternaria*

La clasificación de las especies de *Alternaria* es compleja, y puede atender a diversos criterios fenotípicos y genotípicos. Sin embargo, diferentes estudios filogenéticos (Chou y Wu, 2002; Hong y col., 2005) agrupan las especies de *Alternaria* en cuatro grupos principales: *A. alternata*, *A. porri*, *A. infectoria* y *A. radicina*. Disponer de técnicas genéticas rápidas capaces de diferenciar los grupos de especies de *Alternaria* es importante para la detección precoz de especies fitopatógenas en cultivos sensibles y el establecimiento de medidas preventivas y correctoras, con el fin de reducir las pérdidas económicas en el sector primario. Asimismo, la detección de especies de *Alternaria* productoras de micotoxinas en materias primas vegetales y productos transformados reviste especial interés desde el punto de vista de la protección de la salud de los consumidores. En esta tesis doctoral se ha desarrollado una técnica de PCR múltiple con cebadores específicos para detectar y diferenciar las es-

pecies de *Alternaria* pertenecientes a los principales grupos del género.

El marcador genético empleado para llevar a cabo el diseño de cebadores específicos de grupo fue el gen *Alt a 1*. La alineación y análisis informático de las secuencias del gen *Alt a 1* disponibles en las bases de datos, permitió el diseño de parejas de cebadores para la amplificación de fragmentos de ADN específicos de las especies del grupo de *A. alternata* (118 pb), de *A. porri* (118 pb), de *A. radicina* (131 pb) y de *A. infectoria* (118 pb). Asimismo, con el fin de realizar simultáneamente la detección de *Alternaria* spp. y la identificación del grupo a que pertenece la especie detectada, se utilizó el cebador Dir3Alta1 en una técnica de PCR múltiple, junto a los cebadores específicos de los distintos grupos de especies de *Alternaria*. La especificidad de las parejas de cebadores se confirmó mediante el análisis del ADN extraído a partir de 11 especies de este género, así como de diversas especies fúngicas pertenecientes a otros géneros, levaduras, bacterias, animales y plantas. Todas las parejas de cebadores diseñadas demostraron ser específicas frente al grupo de especies correspondiente, no originando bandas de amplificación a partir del ADN de especies de *Alternaria* pertenecientes a otros grupos. La utilización de los cebadores inversos específicos de los distintos grupos de especies de *Alternaria*, junto con el cebador Dir3Alta1, produjo la amplificación de un fragmento de 97 pb a partir del ADN de todas las especies de *Alternaria* analizadas y no interfirió en la amplificación del fragmento específico de grupo. Además, las parejas de cebadores utilizadas no produjeron bandas

de amplificación a partir del ADN de organismos diferentes al género *Alternaria*.

El límite de detección de la técnica de PCR múltiple desarrollada se determinó mediante la amplificación del ADN obtenido a partir de diluciones decimales de cultivos de *A. alternata*, *A. radicina*, *A. porri* y *A. infectoria* viables e inactivados por calor y muestras de pulpa de tomate inoculadas con las diluciones de cada uno de los cultivos. El límite de detección conseguido en todos los cultivos analizados con cada una de las parejas de cebadores fue de  $10^2$  UFC/mL, tanto en los cultivos viables como en los inactivados por calor a 60 °C/30 min o 90 °C/5 min. Únicamente en el caso de muestras de pulpa de tomate inoculadas con cultivos de *A. alternata* y *A. porri* inactivados a 90 °C durante 5 min el límite de detección fue de  $10^3$  UFC/mL.

Una vez puesta a punto la metodología de PCR múltiple para la detección de *Alternaria* spp. y la identificación de los distintos grupos de especies, se analizaron las 10 muestras de productos comerciales en las que se detectó la presencia de ADN de *Alternaria* spp. con las parejas de cebadores específicas de género descritas en el apartado anterior. El análisis de dichas muestras con los cebadores de cada grupo de especies, junto con el específico de género, puso de manifiesto la presencia de ADN del grupo de *A. infectoria* en las cuatro muestras positivas de papillas de cereales. En las tres muestras de tomate alterado y en los tres productos comerciales de tomate solamente se obtuvo amplificación con los cebadores específicos del grupo de *A. alternata*. Estos

resultados coinciden con los obtenidos mediante el análisis filogenético de las secuencias de los productos de PCR del ITS y el gen *Alt a 1*.

### **3. Relación entre la detección de ADN de *Alternaria* spp. mediante una técnica de PCR y la presencia de micotoxinas producidas por este género en tomate y derivados**

Las técnicas de PCR desarrolladas en este trabajo son rápidas y específicas para la detección de ADN de *Alternaria* spp. en muestras comerciales. Sin embargo, la obtención de resultados positivos mediante técnicas de PCR no implica necesariamente la presencia de micotoxinas en las muestras analizadas.

En esta tesis doctoral se ha puesto a punto una técnica de HPLC para la detección de ALT, AOH y AME, con el fin de comprobar si las técnicas de PCR desarrolladas se podrían utilizar como marcador indirecto de la presencia de micotoxinas producidas por *Alternaria* spp. y, por tanto, como indicador de bioseguridad, en productos hortofrutícolas frescos y transformados.

La técnica de HPLC con detector de array de diodos (DAD) permitió detectar las micotoxinas de *Alternaria* spp. analizadas en menos de 16 minutos, obteniéndose tiempos de retención de 10,8 min para el ALT, 12,8 min para el AOH y 15,6 min para el AME. El límite de detección para cada una de las micotoxinas se determinó a partir de las rectas de calibrado elaboradas con concentraciones de 0,5, 1, 2, 5 y 10 µg/mL para cada una de las micotoxinas. Los límites de detección fueron de 1,7 µg/L para ALT, 19,7

µg/L para AOH y 0,37 µg/L para AME, correspondientes a 0,34, 3,94 y 0,074 µg/kg de producto.

Una vez puesta a punto la metodología, se analizaron por HPLC 90 muestras comerciales de tomates frescos y procesados. Todos los productos comerciales se analizaron también mediante la técnica de PCR con los cebadores específicos de *Alternaria* spp. diseñados en el ITS. El análisis por PCR convencional puso de manifiesto la presencia de ADN de *Alternaria* spp. en 41 de las 90 muestras analizadas (45,6 %), mientras que la detección por HPLC de al menos una de las micotoxinas analizadas se observó en 31 de las 90 muestras (34,4 %). Los recuentos fúngicos obtenidos mediante la siembra de diluciones de las muestras en placas de Sabouraud-CAF fueron de  $10 - 10^3$  UFC/g en las muestras de tomate alterado y tomate desecado, mientras que no se observó crecimiento fúngico en las muestras de tomate sano y el resto de productos procesados. Conviene señalar que en todas las muestras de productos comerciales de las que no se obtuvo amplificación con la pareja de cebadores específicos de *Alternaria* spp., sí se amplificó correctamente el ADN con los cebadores 18SFwEu/18SRvEu, empleados como control positivo de amplificación.

El análisis de los resultados obtenidos permitió concluir que existe una correlación significativa entre la detección de ADN de *Alternaria* spp. y la presencia de ALT, AOH o AME en las muestras de tomate fresco y procesado, puesto que 31 de las 41 muestras positivas por PCR (75,6 %) contenían al menos una de las micotoxinas produ-



cidas por *Alternaria*. La ausencia de ALT, AOH o AME en algunas muestras positivas por PCR, podría indicar la presencia en las mismas de especies de *Alternaria* no productoras de esas micotoxinas, como son las pertenecientes al grupo de *A. infectoria* (Andersen y col., 2009). Además, algunas especies pertenecientes al grupo de *A. alternata*, como *A. longipes*, no siempre producen estas micotoxinas, ya que la síntesis está determinada por las condiciones ambientales en que se desarrolla el moho (Andersen y col., 2001). Esta hipótesis se comprobó mediante secuenciación, puesto que la información contenida en las secuencias nucleotídicas amplificadas con los cebadores Dir1ITSAlt e Inv1ITSAlt determinó la presencia de ADN de *A. infectoria* en seis de las muestras positivas por PCR y negativas por HPLC. En las cuatro muestras restantes se identificó ADN de especies pertenecientes al grupo de *A. alternata*, aunque no se pudo determinar la especie concreta.

#### **4. Desarrollo de técnicas de PCR y RT-PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de *Alternaria* spp. en productos hortofrutícolas frescos y procesados**

En los últimos años, los ensayos de PCR han evolucionado hacia procedimientos más rápidos y automatizados entre los que destaca la técnica de PCR en tiempo real. Esta técnica se basa en el empleo de compuestos fluorescentes y proporciona un resultado numérico en tiempo real que permite la cuantificación de la especie de interés y el tratamiento estadístico de los datos obtenidos.

En esta tesis doctoral se ha desarrollado una técnica de PCR en tiempo real utilizando una sonda TaqMan® para la detección y cuantificación de *Alternaria* spp. en productos hortofrutícolas frescos y procesados. Para cumplir este objetivo, se utilizaron los cebadores diseñados en el ITS. Como control positivo de amplificación se empleó la pareja de cebadores conservados descrita anteriormente, y la sonda TaqMan® 18STM (Martín y col., 2009). El sistema específico permitió la amplificación del ADN de todas las especies de *Alternaria* analizadas. El análisis de ADN procedente de diversos organismos diferentes al género *Alternaria*, confirmó la especificidad del sistema en tiempo real desarrollado.

El empleo de la sonda TaqMan® en la técnica de PCR en tiempo real desarrollada aportó ventajas frente a la técnica de PCR convencional ya que mejoró la sensibilidad alcanzada. En este caso, el límite de detección del ensayo fue de 1 UFC/mL, tanto en cultivo como en pulpa de tomate, y no se vio afectado por el tratamiento térmico de 90 °C/5 min.

Finalmente, la técnica de PCR en tiempo real con sonda TaqMan® se empleó para el análisis de diversos productos hortofrutícolas frescos y procesados. Los resultados obtenidos demostraron la presencia de ADN de *Alternaria* spp. en 112 de las 190 muestras analizadas (58,9 %). Sin embargo, el ADN procedente de las muestras negativas para *Alternaria* spp. sí se amplificó con los cebadores y sonda empleados como control positivo de amplificación. Además, se observó una correlación significativa entre

los recuentos de *Alternaria* spp. estimados por PCR en tiempo real y los recuentos obtenidos en agar patata zanahoria (PCA) ( $R^2 = 0,9006$ ) en productos hortofrutícolas frescos.

Disponer de métodos para la detección precoz de *Alternaria* spp. viables en las materias primas vegetales durante las primeras fases de colonización y desarrollo permitiría a las industrias de transformación rechazar lotes de materias primas inadecuadas y aplicar medidas preventivas para evitar la formación de micotoxinas. En esta tesis doctoral se ha desarrollado una técnica de RT-PCR en tiempo real, basada en la amplificación del ARN ribosómico, para la detección y cuantificación de *Alternaria* spp. viables en alimentos.

La técnica de RT-PCR en tiempo real se realizó en dos etapas, utilizando en la primera cebadores de hexámeros aleatorios y la transcriptasa inversa para la obtención de ADNc a partir del ARN molde. En la segunda etapa, se empleó el sistema de cebadores y sonda descritos anteriormente para la cuantificación del ADNc de *Alternaria* spp. mediante PCR en tiempo real. El sistema específico permitió la amplificación del ARN de todas las especies de *Alternaria* analizadas, no originando señal de amplificación a partir del ARN de organismos diferentes al género *Alternaria*.

El límite de detección del ensayo fue de 1 UFC/mL, tanto en los cultivos de *A. alternata*, *A. radicina*, *A. porri* y *A. infectoria* viables como en pulpa de tomate inoculada con dichos cultivos. Sin embargo, en el caso de los cultivos tratados térmicamente a

90 °C/5 min, el límite de detección varió en función del tiempo de espera anterior a la extracción del ARN, no obteniéndose amplificación cuando la extracción se realizó transcurridas 48 h.

Para comprobar la influencia del tratamiento térmico empleado en la inactivación de *Alternaria* spp., un cultivo de *A. alternata* viable y el mismo cultivo inactivado a 90 °C/5 min se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados demostraron que un 1,95 % de las células presentaban actividad metabólica inmediatamente después del tratamiento, por lo que contenían moléculas de ARN estables que podrían ser amplificadas por la técnica de RT-PCR en tiempo real desarrollada.

Un problema que puede afectar a los protocolos de RT-PCR es la posible obtención de falsos positivos debidos a la presencia de ADN residual de la muestra. Para comprobar la ausencia de ADN, se incluyó un control negativo sin transcriptasa inversa con cada una de las muestras analizadas, no obteniéndose señal de amplificación ni en las diluciones de los cultivos de *Alternaria* spp. ni en las muestras de pulpa de tomate inoculadas con estos cultivos.

La aplicabilidad del sistema de RT-PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de *Alternaria* spp. viables se determinó mediante el análisis de 110 muestras de productos hortofrutícolas frescos y procesados. El análisis con la técnica de RT-PCR en tiempo real demostró la presencia de ARNr de *Alternaria* spp. en 53 de las 110 muestras analizadas (48,2 %), no obteniéndose amplificación a partir del control negati-

vo sin transcriptasa inversa incluido para cada muestra. Todas las muestras positivas por RT-PCR en tiempo real presentaron recuentos de *Alternaria* spp. en PCA entre 10 y

$6 \times 10^4$  UFC/g, mostrando una correlación significativa entre ambos métodos para detectar y cuantificar la presencia de *Alternaria* spp. viable en alimentos ( $R^2 = 0,9881$ ).

Food contamination with toxigenic filamentous fungi represents an important hazard for animal and human health, and it has also a considerable economic impact in the food industry. The toxigenic moulds most commonly found in foods belong to the genera *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* and *Alternaria*. The genus *Alternaria* includes saprophytic and pathogenic species that are widely distributed in soil and organic matter in decomposition. *Alternaria* spp. persists as saprophytic mycelium in plant debris during winter. Under favourable conditions in the spring, the fungi produce spores that are carried by wind and splashing rain. The conidia infect the plant by entering through small wounds, stomata, or direct penetration. Diseases caused by *Alternaria* species are very common and have a worldwide distribution. Disease symptoms affect the stems, leaves and fruits, depending on the *Alternaria* species involved, and the intensity of infection. As plant pathogens, they can seriously affect agriculture by reducing crop yield in the field and causing considerable economic losses to farmers and food processing industry. Moreover, certain species are also capable of producing mycotoxins and pose a health hazard as they can contaminate raw or manufactured plant products like juices, sauces and preserves, thereby entering the human food chain.

To avoid the presence of *Alternaria* spp. mycotoxins in foodstuffs, preventive measures should be applied to minimize contamination by toxigenic species or prevent their development. Furthermore, availability of rapid methods for the early detection of *Alternaria* spp. is necessary in

order to assess quality and safety control of raw materials and processed products in the food industry.

The current routine technique for detection and identification of *Alternaria* spp. often requires culture isolation and further morphological and physiological characterization (Ellis and Ellis, 1997; Samson et al., 2004). However, this process is tedious and time-consuming, which hampers its use for routine analysis. Advances in molecular biology have allowed the development of new fungal identification and detection techniques based on DNA analysis. Among genetic techniques currently applied to detection and identification of toxigenic moulds in foodstuffs, polymerase chain reaction (PCR) is the most common approach due to its high sensitivity, specificity, and speed (Niessen, 2007).

Taking these considerations into account, the aim of this work was to develop several PCR-based techniques (PCR using specific primers, real-time PCR and real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR)) for the detection and identification of *Alternaria* spp. Moreover, a high performance liquid chromatography (HPLC) method has been developed for the detection of alternene (ALT), alternariol (AOH) and alternariol monomethyl ether (AME) in raw and processed vegetables in order to assess the ability of the PCR assay to identify food samples containing *Alternaria* spp. mycotoxins.

# **1. Development of PCR techniques using genus-specific primers for the detection of *Alternaria* spp. in raw and processed foods**

In this study, *Alternaria* spp. detection by PCR was based on two genetic markers, the internal transcribed spacer (ITS) ribosomal RNA and the *Alt a 1* nuclear gene, encoding the major allergen produced by *A. alternata* and other species of this genus. These genetic markers were chosen because they have an adequate length and an appropriate degree of sequence divergence. The comparison of ITS rRNA sequences available in the databases for several *Alternaria* species allowed the design of the primer pair Dir1ITSAlt/Inv1ITSAlt. On the other hand, primers Dir3Alta1 and Inv4Alta1 were designed to amplify a common DNA fragment from the *Alt a 1* gene of all the *Alternaria* species. These primer pairs successfully amplified DNA fragments of approximately 370 and 350 base pairs (bp) from the ITS and *Alt a 1* gene, respectively, in all *Alternaria* species analysed. No cross-species amplification was obtained from other fungal, bacterial, yeast, animal, or plant species analysed. The use of single copy genetic markers, such as the *Alt a 1* gene, may represent a drawback for the analysis of heat treated samples, where some degree of DNA degradation is possible, reducing the PCR signal. For this reason, to increase the efficiency of the technique developed, an additional primer, Dir5cAlta1, was designed, that combined with Inv4Alta1 delimit a DNA fragment of approximately 195 bp in *Alternaria* spp.

The information obtained after sequencing and phylogenetic analysis of DNA variations of the PCR products obtained with the primer pairs Dir1ITSAlt/Inv1ITSAlt and Dir3Alta1/Inv4Alta1, allowed the differentia-

tion of four *Alternaria* species groups: *A. alternata*, *A. porri*, *A. infectoria* and *A. radicina*.

A common problem of PCR-based methods for food analysis is failure of DNA amplification due to the presence of inhibitory substances in the samples. Inhibition influences the outcome of PCR reaction by lowering or completely preventing the amplification. Thus, it is essential to include positive amplification controls in order to avoid false-negative results. For this reason, a positive amplification control primer pair, 18SFwEu/18SRvEu (Martín et al., 2009), was included in a duplex PCR format with the *Alternaria* specific primer pairs. These primers successfully amplified a conserved 99 bp fragment on the 18S rRNA gene of all the eukaryotic species analysed, avoiding any possible false-negative amplification throughout the assays due to PCR inhibition.

Sensitivity assessment of the genus-specific assays (Dir1ITSAlt/Inv1ITSAlt and Dir5cAlta1/Inv4Alta1) was carried out using 10-fold dilutions of *A. alternata*, *A. radicina*, *A. porri* and *A. infectoria* viable cultures. The same cultures were also analysed after heat treatments at 90 °C for 5 min and 60 °C for 30 min, to assess the influence of thermal treatments on the assay performance. The effect of the food matrix on the detection of *Alternaria* spp. was studied by analysis of tomato pulp samples artificially contaminated with either viable or heat inactivated *Alternaria* spp. cultures. The detection limit was 10<sup>2</sup> CFU/mL, in *Alternaria* spp. viable cultures as well as in experimentally inoculated tomato pulp. The detection limit was not

modified after heat inactivation of the cultures.

The applicability of the techniques developed for detection and identification of DNA from *Alternaria* spp. in foodstuffs was assessed through analysis of 48 commercial raw and processed tomato products, and 11 cereal-based infant food samples. The specific primer pairs revealed the presence of *Alternaria* spp. DNA in 10 out of 59 samples analysed (17 %), corresponding to 4 cereal-based infant food samples, 3 mouldy tomatoes, 2 sun-dried tomato samples, and one tomato sauce. Successful amplification was obtained with the positive amplification control primers in all samples analysed, confirming that the samples where *Alternaria* DNA was not detected did not correspond to false-negative results. Mould counts obtained by plating in Sabouraud-Chloramphenicol (Sabouraud-CAF) were positive in all mouldy tomato fruits analysed, with  $10^3$  CFU/g. Moreover, mould counts of  $10^2$  CFU/g were obtained in the two sun-dried tomato samples that resulted positive in the *Alternaria*-specific PCR. The mould counts in the rest of raw and processed tomato products, as well as in cereal-based infant food samples, were negative. Phylogenetic analysis of the sequences obtained from positive samples clustered the sequences obtained from the six tomato samples and tomato products with those of species belonging to the *A. alternata* group, whereas sequences obtained from the cereal-based infant food samples were clustered with those of species belonging to the *A. infectoria* group.

## 2. Development of a PCR technique for the identification of *Alternaria* species-groups

The classification of *Alternaria* species is very complex. However, phylogenetic studies support grouping *Alternaria* species in four main species-groups (Chou y Wu, 2002; Hong et al., 2005): *A. alternata*, *A. porri*, *A. infectoria* and *A. radicina*. They can produce serious problems in agriculture by reducing crop yields in the field, and causing spoilage during storage. Moreover, several species, mainly in the *A. alternata* species-group, produce mycotoxins and allergens. Because of their different consequences for agricultural production and for human health, there is a need for a sensitive and rapid test that could detect and correctly identify *Alternaria* species-groups along the food chain. In this work, a multiplex PCR method was developed for detection and identification of the main *Alternaria* species-groups in raw and processed foodstuffs.

The *Alt a 1* gene was chosen as genetic marker to design species-group-specific primers. The alignment of *Alt a 1* gene sequences available in the databases allowed the design of primers for the amplification of specific DNA fragments in the species-groups of *A. alternata* (118 bp), *A. porri* (118 bp), *A. radicina* (131 bp) and *A. infectoria* (118 bp). To simultaneously detect *Alternaria* spp. and identify the species-group, the primer Dir3Alta1 was designed and included in a seminested PCR with each of the species-group specific primer pairs. The specificity of the primer pairs designed was tested by PCR analysis of DNA obtained from 11 *Alt*-

*ternaria* species and also from several fungal, bacterial, yeast, animal and plant species. Each primer pair amplified exclusively the specific DNA fragment, showing no amplification of DNA from *Alternaria* strains belonging to other *Alternaria* groups. The primer Dir3Alta1, combined with the species-group-specific reverse primers, amplified a DNA fragment of 97 bp from all *Alternaria* spp. analysed. Moreover, no amplification bands were observed when other organisms were analysed with the species-group-specific primers.

Sensitivity of the seminested PCR was tested using Dir3Alta1 combined with the four species-group-specific primers pairs, and DNA from *A. alternata*, *A. radicina*, *A. porri* and *A. infectoria* viable or heat inactivated cultures, and also DNA from tomato pulp inoculated with those cultures. The detection limit was close to  $10^2$  CFU/mL for all *Alternaria* species-groups, and it was not modified after heat inactivation of the cultures at 60 °C for 30 min or at 90 °C for 5 min. However, the sensitivity was  $10^3$  CFU/mL for tomato pulp inoculated with *A. alternata* and *A. porri* cultures heat inactivated at 90 °C for 5 min.

The applicability of the seminested PCR developed for the detection of *Alternaria* spp. and the identification of the species-group was assessed through analysis of the 10 samples that tested positive with the *Alternaria* spp. specific primers described in the previous section. The seminested PCR demonstrated that cereal-based infant food positive samples were amplified with *A. infectoria* group-specific primers, showing no

amplification with the other group-specific primers pairs; whereas the three mouldy tomatoes and the three positive tomato products were exclusively amplified with *A. alternata* group-specific primers. These results are in agreement with those obtained by sequencing and phylogenetic analysis of DNA variations of the PCR products obtained from *Alternaria* positive samples.

### **3. PCR-based assay for the detection of *Alternaria* species and correlation with HPLC determination of altenuene, alternariol and alternariol monomethyl ether production in tomato products**

The PCR techniques developed in this work are rapid and specific for detection of *Alternaria* spp. DNA in commercial food products. However, the presence of DNA in the foodstuffs analysed does not necessarily lead to mycotoxins production.

In this study, a high-performance liquid chromatography (HPLC) technique was developed for the detection of ALT, AOH y AME, in order to assess the ability of the PCR assays to be used as quality and biosecurity markers of raw materials or processed food where *Alternaria* spp. and their toxins can be present.

The developed HPLC method with diode-array detection (DAD) was able to detect and resolve the major toxins of *Alternaria* spp. (ALT, AOH and AME) in less than 16 min, with retention times of 10.8, 12.8 and 15.6 min, respectively. The detection limit for each mycotoxin was determined from standard curves constructed with concentrations of 0.5, 1, 2, 5 and 10 µg/mL for each mycotoxin. The detection limit for ALT, AOH and

AME were 1.7, 19.7 and 0.37 µg/L, corresponding to 0.34, 3.94 and 0.074 µg/kg, respectively.

The HPLC technique developed was used to analyse the occurrence of ALT, AOH and AME in 90 commercial raw and processed tomato products. Moreover, all samples were also analysed with the previously developed PCR method based on the ITS genetic marker. The PCR assay revealed the presence of *Alternaria* spp. DNA in 41 out of 90 samples (45.6 %), while HPLC detected at least one of the *Alternaria* spp. mycotoxins within 31 out of the 90 samples (34.4 %). Moulds were not detected in unspoiled tomato samples by plating in Sabouraud-CAF, while counts in mouldy tomatoes were in the range of  $10^2$  -  $10^3$  CFU/g. The mould counts in the sun-dried tomato samples that tested positive by PCR were in the range of  $10$  -  $10^2$  CFU/g, but plating on Sabouraud-CAF did not show the presence of viable moulds in the rest of tomato products analysed. It should be noted that all samples in which no amplification was obtained with the *Alternaria* spp. specific primer pair, were successfully amplified with the positive control primers 18SFwEu and 18SRvEu.

In this work, a good correlation was found between PCR detection of DNA from *Alternaria* spp. and the presence of ALT, AOH or AME in tomato samples. The results revealed that 31 out of 41 PCR positive samples (75.6 %) were contaminated with at least one of the *Alternaria* spp. mycotoxins analysed. The absence of ALT, AOH and AME in a positive PCR sample can be explained by several reasons. First, it could be

due to contamination by *Alternaria* species that do not produce the mycotoxins analysed, like those from the *A. infectoria* species-group (Andersen et al., 2009). Moreover, some species from the *A. alternata* species-group, like *A. longipes*, do not always produce these mycotoxins. Furthermore, not only does the production depend on the fungal strain, but also on the environmental growth conditions (Andersen et al., 2001). Sequence analysis of the PCR products obtained with the Dir1ITSAlt and Inv1ITSAlt primers from the samples that tested positive for *Alternaria* DNA and negative for the presence of mycotoxins was performed to identify the *Alternaria* species groups present in those samples. DNA from *A. infectoria* species-group was detected in six samples analysed, explaining why ALT, AOH and AME were absent in these samples. DNA from *A. alternata* species-group was amplified in the remaining four samples, but sequencing of the ITS PCR products did not allow identification up to the species level in the *A. alternata* species-group.

#### **4. Development of real-time PCR and RT-PCR techniques for the detection and quantification of *Alternaria* spp. in raw and processed vegetables**

Real-time PCR is a powerful technique for the detection and quantification of a given specific nucleic acid template present in a sample. The technique uses fluorescent molecules to monitor the generation of amplification products during each amplification cycle, and the amount of template can be numerically obtained by advanced analytical methods. Real-time PCR is markedly more



sensitive and accurate than other PCR-based approaches, giving quantitative results difficult to obtain with conventional end-point PCR.

In this work, a TaqMan<sup>®</sup> real-time PCR technique was developed for the detection and quantification of *Alternaria* spp. in foodstuffs. To accomplish this objective, the primer pair previously designed for the amplification of a specific DNA fragment in the ITS rRNA of *Alternaria* spp. was used. Moreover, universal primers (18SFwEu/18SRvEu) and probe (18STM) designed by Martín et al. (2009), were used as positive amplification control of the assay. The genus-specific PCR system was tested for its selectivity and cross-reactivity, showing no cross amplification with DNAs from different organisms.

The results obtained showed that the TaqMan<sup>®</sup> probe-based real-time PCR assay developed increased the sensitivity compared to the conventional PCR technique previously developed. The detection limit was 1 UFC/mL, both in *A. alternata* viable culture and in experimentally inoculated tomato pulp, and was not modified after heat inactivation of the culture at 90 °C for 5 min.

Finally, several commercial raw and processed fruits and vegetables were analysed to evaluate the usefulness of the real-time PCR method developed for the detection and quantification of DNA from *Alternaria* spp. The real-time PCR analysis demonstrated the presence of *Alternaria* spp. DNA in 112 out of the 190 commercial products analysed (58.9 %). Nevertheless, amplification was obtained with the positive control system in all the food samples analysed.

Moreover, the estimated *Alternaria* spp. counts were plotted against the *Alternaria* spp. counts obtained by plating raw fruit and vegetables samples on potato carrot agar (PCA), showing a significant correlation ( $R^2 = 0.9006$ ).

Because of the importance of the genus *Alternaria* in food quality and safety, fast, sensitive, and reliable methods for the detection and enumeration of viable *Alternaria* spp. in foods are needed to identify possible routes of contamination and to design adequate strategies to prevent spoilage and reduce economical losses. Such methods could help industry on the refusal or acceptance of raw materials for processing. In this study, a real-time RT-PCR assay based on the amplification of ITS rRNA was developed for the detection and quantification of viable *Alternaria* spp. in foodstuffs.

Real-time RT-PCR was performed in two steps. First, the transcription of RNA to cDNA was carried out using random primers and the reverse transcriptase. As a second step, to quantify cDNA generated by reverse transcription from target RNA, real-time PCR with TaqMan<sup>®</sup> probe assay previously described was used. The genus-specific PCR system was tested for its selectivity and cross-reactivity, showing no cross amplification with RNAs from different organisms.

The sensitivity of the method was 1 CFU/mL, in *A. alternata*, *A. radicina*, *A. porri* and *A. infectoria* viable cultures, and also in experimentally inoculated tomato pulp. However, in the heat treated cultures at 90 °C for 5 min, the detection limit was related to the elapsed time between heat

treatment and RNA extraction, not yielding amplification from RNA extracted 48 h after the heat treatment.

To analyse the effect of heat treatments on the viability of *Alternaria* spp., an *A. alternata* culture was stained with propidium iodide before and after heat treatment at 90 °C/5 min, and then analysed by flow cytometry. When samples of heat inactivated culture were stained just after the heat treatment, the percentage of dead cells was 98.05 %. Thus, 1.95 % of the initial *A. alternata* population maintained some metabolic activity just after the heat treatment and contained ITS rRNA target fragments that could be detected by real-time RT-PCR.

A common problem of RT-PCR methods is the possibility to obtain false positives due to the presence of residual DNA in the samples. Thus, negative controls without reverse transcriptase were always

included to check for the presence of contaminant DNA, and no amplification signal was observed from the culture dilutions and tomato pulp samples analysed.

The reliability of the real-time RT-PCR procedure to detect viable *Alternaria* spp. cells in 110 commercial samples was tested in raw and processed fruits and vegetables. The real-time RT-PCR analysis demonstrated the presence of *Alternaria* spp. rRNA in 53 out of the 110 samples analysed (48.2 %). No amplification signal was obtained from the negative controls without reverse transcriptase included for all samples analysed. *Alternaria* spp. counts in PCA of samples that tested positive by real-time RT-PCR were between 10 and  $6 \times 10^4$  CFU/g, showing a significant correlation ( $R^2 = 0.9881$ ) between both methods to detect and quantify viable *Alternaria* spp. in naturally contaminated samples.



*CAPÍTULO I*  
*Exposición General del*  
*Problema a Investigar*

---



Los mohos son microorganismos cuya presencia en los alimentos puede tener consecuencias diversas y en ocasiones son de gran utilidad en la industria alimentaria. Determinadas especies de géneros fúngicos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor* o *Geotrichum* participan en la maduración de quesos, productos cárnicos crudos madurados y alimentos orientales a base de soja y cereales. Además, se emplean para la producción de metabolitos usados como aditivos en diferentes tipos de alimentos como zumos, licores o productos lácteos (Soriano, 2007). Sin embargo, también tienen consecuencias negativas, ya que la contaminación fúngica es una de las principales causas de alteración de los alimentos y la presencia de determinadas especies de géneros como *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* o *Alternaria* constituye una amenaza para la salud de los consumidores debido a la producción de compuestos tóxicos para el ser humano (micotoxinas).

Las autoridades sanitarias europeas han establecido niveles máximos permitidos de determinadas micotoxinas como las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y M<sub>1</sub>, ocratoxina A, patulina, deoxinivalenol, zearalenona, fumonisinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> y toxinas T-2 y HT-2 en los alimentos (Comisión Europea 2006b, 2007, 2010a, b). Actualmente, la UE no tiene establecidos límites máximos para ninguna de las micotoxinas de *Alternaria* spp. aisladas en alimentos. Sin embargo, son cada vez más frecuentes los casos de productos hortofrutícolas y sus derivados en los que se demuestra la presencia de especies del género *Alternaria*, muchas de ellas productoras de micotoxinas como el alternueno (ALT),

alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), ácido tenuazónico (TeA) y altertoxinas (ATX). Este aumento en la incidencia de alimentos contaminados con *Alternaria* spp. y/o sus micotoxinas, causa especial preocupación por la repercusión que puede tener su presencia en la salud de los consumidores, debido a su elevado poder toxicológico (Bottalico y Logrieco, 1998; Ostry, 2008). En este sentido, teniendo en cuenta los datos sobre toxicidad y la creciente presencia de estas toxinas en alimentos, el Instituto Federal de Evaluación de Riesgos de Alemania (BfR, 2003), Comité Científico sobre Alimentos de la República Checa (CSCF, 2008) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2011), consideran necesario realizar nuevos estudios sobre la toxicidad de las micotoxinas producidas por *Alternaria* spp. y su presencia en alimentos, con el fin de disponer de datos objetivos que permitan evaluar la situación actual con vistas a establecer límites máximos permitidos.

Los procedimientos analíticos más utilizados para la detección de micotoxinas de *Alternaria* spp. en alimentos incluyen diversas técnicas inmunológicas (Yu y col., 1999; Ackermann y col., 2011; Burkin y Kononenko, 2011) y cromatográficas, como la cromatografía en capa fina (TLC) (Matysik y Giryn, 1996; Skarkova y col., 2005) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Andersen y Frisvad, 2004; Solfrizzo y col., 2004; Asam y col., 2010; Noser y col., 2011; Oviedo y col., 2011). Una de las limitaciones que presentan las técnicas inmunológicas es que se necesitan anticuerpos específicos para cada una de las micotoxinas, pudiendo además aparecer reacciones cruzadas con

componentes de los alimentos o metabolitos fúngicos presentes en estos (Schmechel y col., 2008). Con relación a los métodos cromatográficos, la técnica de HPLC es la más utilizada para el análisis de micotoxinas en los alimentos, debido a su sensibilidad y especificidad. Sin embargo, el mayor inconveniente de estas técnicas es que son laboriosas y caras y que requieren disponer de personal especializado. Además, debido a que en un mismo alimento pueden estar presentes múltiples micotoxinas, no resulta práctico ni realista detectar cada una de ellas, puesto que su elevado coste lo haría inviable. Por este motivo, desde el punto de vista preventivo adquiere una mayor relevancia la detección del moho productor de micotoxinas. Esto permitiría a las industrias elaboradoras establecer un control adecuado de sus proveedores, mejorar la trazabilidad de sus productos y eliminar de los canales de comercialización los lotes que puedan representar un peligro para la salud del consumidor.

Las técnicas genéticas, concretamente aquellas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), constituyen una estrategia idónea para la detección e identificación rápida de *Alternaria* spp. en alimentos. Las principales ventajas de las técnicas genéticas sobre los métodos de identificación fenotípica, como las técnicas de detección de micotoxinas, son su rapidez, sensibilidad y que no se ven afectadas por las condiciones ambientales (Niessen, 2007). Las técnicas de PCR convencionales son útiles para la identificación y la detección cualitativa de *Alternaria* spp. en alimentos. Sin embargo, la metodología de PCR en

tiempo real es más adecuada cuando se pretende cuantificar la presencia de mohos toxigénicos en alimentos (Andersen y col., 2006; González-Salgado y col., 2009; Rodríguez y col., 2011; Atoui y col., 2012).

Las técnicas genéticas basadas en la detección del ADN, al ser esta una molécula relativamente estable, no permiten la discriminación entre células viables y no viables. Esta característica supone una ventaja frente a las técnicas fenotípicas de detección e identificación fúngica en productos hortofrutícolas transformados, ya que permite detectar la utilización de materias primas alteradas aunque los mohos ya no se encuentren viables. Sin embargo, el análisis del producto final no permite establecer acciones preventivas. La detección precoz de *Alternaria* spp. en las materias primas vegetales durante las primeras fases de colonización y desarrollo permitiría a las industrias de transformación rechazar lotes de materias primas inadecuadas y aplicar medidas preventivas para evitar la formación de micotoxinas. Teniendo en cuenta que el ARN se degrada poco tiempo después de la muerte celular, la técnica que hoy en día ofrece un mayor potencial para la detección y/o discriminación de las células viables y no viables es la de RT-PCR, que emplea la transcriptasa inversa en la primera etapa de la amplificación.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en esta tesis doctoral se plantea la utilización de diversas técnicas (PCR convencional, PCR en tiempo real y RT-PCR en tiempo real) para la detección e identificación de especies de *Alternaria*. Asimismo se propone el desarrollo de una técnica de cromatografía

líquida de alta resolución (HPLC) para la detección de ALT, AOH y AME en productos hortofrutícolas, con el fin de comprobar si las técnicas de PCR desarrolladas se podrían utilizar como marcador indirecto de la presencia de micotoxinas producidas por *Alternaria* spp. en productos hortofrutícolas frescos y transformados. Los objetivos desarrollados han sido los siguientes:

1) **Selección y obtención de cepas de referencia de *Alternaria* y otros géneros fúngicos.**

2) **Selección de marcadores genéticos adecuados.** Se han empleado el espaciador interno de la transcripción (ITS) y el gen *Alt a 1*.

3) **Desarrollo de técnicas de PCR con cebadores específicos** para la detección de *Alternaria* spp. en alimentos. Para ello ha sido necesario:

- Alinear y analizar las secuencias de los genes de interés disponibles en las base de datos y diseñar cebadores específicos de género.
- Preparar diluciones de cultivos de especies de *Alternaria* e inocularlos en muestras de pulpa de tomate.
- Someter los cultivos y muestras de tomate contaminadas a tratamientos térmicos de 90°C/5 min y 60°C/30 min.
- Emplear los cebadores diseñados en técnicas de PCR para la detección de *Alternaria* spp. en alimentos.

4) **Desarrollo de una técnica de PCR múltiple** para la diferenciación de grupos de especies del género *Alternaria*.

- Alinear y analizar las secuencias del gen *Alt a 1* disponibles en las base de datos y diseñar cebadores específicos de grupo.
- Preparar diluciones de cultivos de especies de *Alternaria* e inocularlos en muestras de pulpa de tomate.
- Someter los cultivos y muestras de tomate contaminadas a tratamientos térmicos de 90°C/5 min y 60°C/30 min.
- Emplear los cebadores diseñados en técnicas de PCR múltiple para la detección de *Alternaria* spp. y la identificación de los distintos grupos de especies en alimentos.

5) **Desarrollo de una técnica de HPLC** para la detección de ALT, AOH y AME en productos hortofrutícolas frescos y procesados.

6) **Desarrollo de técnicas de PCR y RT-PCR en tiempo real** para la detección y cuantificación de *Alternaria* spp. en productos hortofrutícolas frescos y procesados, empleando como sistema de detección una sonda de hibridación Taqman®.





## *CAPÍTULO II*

### *Introducción*

---



La alteración fúngica de los alimentos no solo constituye un problema de deterioro organoléptico que produce pérdidas económicas, sino que también es una amenaza para la salud de los consumidores debido a la posible existencia de mohos toxigénicos como algunas especies de los géneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Alternaria*. *Alternaria* es un género fúngico muy común, donde se incluyen numerosas especies patógenas y saprofitas ampliamente distribuidas en el suelo y la materia orgánica en descomposición. Como saprofito, *Alternaria* spp. persiste en forma de micelio durante los inviernos, y bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura produce conidios que se diseminan con la ayuda del viento, agua, insectos, etc. Los conidios de *Alternaria* que colonizan las plantas, germinan e infectan las hojas, tallos o frutos, donde provocan lesiones de diversa consideración según la intensidad de la infección.

### II.1. *ALTERNARIA* SPP.: MORFOLOGÍA Y ECOLOGÍA

El género *Alternaria* fue descrito por Nees en 1817, con *A. alternata* (originariamente *A. tenuis*) como especie tipo. Debido a la ausencia de un ciclo de reproducción sexual, este género se clasificó dentro del filo de hongos imperfectos o mitosporicos. *Alternaria* spp. se caracteriza por la producción de conidióforos simples y erectos, en cuyo extremo se forman cadenas simples o ramificadas de conidios. Los conidios o dictiosporas son multicelulares, de color pardo y con septos tanto transversales como longitudinales.

Se han identificado alrededor de 300 especies en el género *Alternaria*, que se clasifican en seis grandes grupos atendiendo a las características de los conidios (Simmons, 2007):

- 1) Conidios grandes: en este grupo se incluyen especies productoras de conidios alargados, generalmente solitarios, caracterizados por la presencia de un apéndice terminal de tamaño heterogéneo, en ocasiones ramificado y/o filamentosos. En este grupo se engloban especies como *A. cucumerina*, *A. brassicae*, *A. dauci*, *A. limicola*, *A. macrospora*, *A. porri*, *A. solani* y *A. sonchi* (Figura 1A).
- 2) Conidios pequeños: en este grupo se incluyen especies productoras de conidios esféricos, ovoides o elipsoides, sin apéndices terminales, solitarios o formando cadenas (simples o ramificadas). La identificación morfológica de este grupo, basada en la formación de los conidios, es muy compleja. Por este motivo, para facilitar la identificación, las especies de *Alternaria* se han clasificado en cinco grandes grupos atendiendo a su modelo de esporulación:
  - 2.1) El grupo de *A. radicina* engloba especies como *A. japonica*, *A. petroselini*, *A. radicina* y *A. smyrnii*. Presentan conidios solitarios o formando pequeñas cadenas o agregados (Figura 1B).
  - 2.2) El grupo de *A. tenuissima* incluye especies como *A. gaisen*, *A. longipes*, *A. mali* y *A. tenuissima*. Presentan cadenas de conidios de tamaño muy heterogéneo, formadas

a partir de conidióforos primarios cortos y ocasionalmente presentan ramificaciones cortas sobre un conidióforo secundario (Figura 1C).

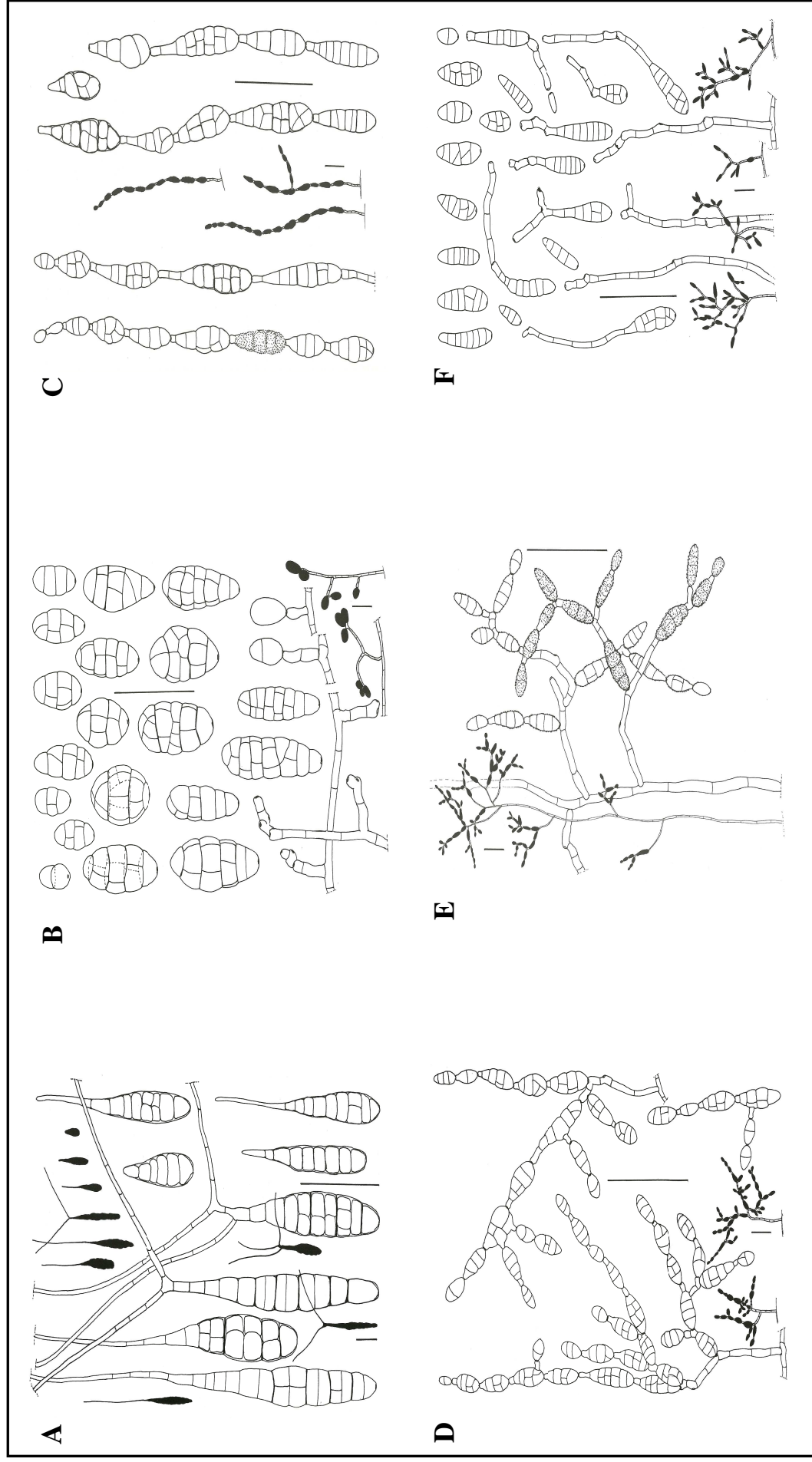
- 2.3) El grupo de *A. alternata* presenta conidióforos primarios cortos, a partir de los cuales se forman cadenas de conidios ramificadas por medio de conidióforos secundarios. Este grupo comprende especies como *A. alternata*, *A. citri* y *A. dumosa* (Figura 1D).
- 2.4) El grupo de *A. arborescens* incluye especies como *A. arborescens*, *A. armoraciae* y *A. senecionicola*, caracterizadas por la presencia de conidióforos primarios alargados y erectos en cuya parte apical se forman cadenas o agregados de conidios. Además, pueden presentar ramificaciones a partir de la formación de conidióforos secundarios (Figura 1E).
- 2.5) El grupo de *A. infectoria* engloba especies como *A. conjuncta*, *A. infectoria*, *A. novae-zelandiae* y *A. oregonensis*. Presentan conidios en forma de agregados o cadenas ramificadas. Este grupo se caracteriza por la presencia de un elevado número de conidióforos secundarios a partir de los cuales se forman las ramificaciones (Figura 1F).

Entre los factores ambientales que influyen en el desarrollo de *Alternaria* spp. destacan la temperatura y la actividad de agua ( $a_w$ ). Su temperatura óptima de crecimiento

está comprendida entre 22 y 28 °C, siendo 25 °C la idónea para la esporulación. Sin embargo, el intervalo de temperaturas en que *Alternaria* spp. puede crecer abarca desde -3 °C hasta 35 °C (Sommer, 1985), por lo que con frecuencia es responsable de alteraciones en alimentos vegetales almacenados en condiciones de refrigeración o congelación (Barkai-Golan y Paster, 2008). Con relación a la actividad de agua ( $a_w$ ), el crecimiento de *Alternaria* spp. es óptimo a valores elevados (0,99), pero la  $a_w$  mínima necesaria para su desarrollo es de 0,84 (Magan y Lacey, 1984; Magan y Baxter, 1994; Oviedo y col., 2011). El estudio de las condiciones necesarias para el crecimiento de *Alternaria* spp. se realiza en situaciones y medios de cultivo adecuados para su desarrollo. Sin embargo, dicho crecimiento puede verse afectado cuando se produce en piosos, alimentos u otros sustratos.

## II.2. *ALTERNARIA* SPP. COMO ALTERANTE DE CULTIVOS VEGETALES ANTES Y DESPUÉS DE LA RECOLECCIÓN

*Alternaria* spp. puede invadir los cultivos vegetales antes y después de la recolección y es responsable de considerables pérdidas económicas, debido a que reduce el rendimiento de las cosechas y produce alteraciones en los vegetales durante su almacenamiento. Se han descrito alteraciones provocadas por *Alternaria* spp. en una gran variedad de cereales, hortalizas y cultivos frutales, tanto leñosos como herbáceos (Pitt y Hocking, 1997; Ostry, 2008; Logrieco y col., 2009).



**Figura 1.** Modelo de esporulación perteneciente a los grupos de especies de *A. porri* (A), *A. radicina* (B), *A. tenuissima* (C), *A. alternata* (D), *A. arborescens* (E) y *A. infectoria* (F). Barras = 50  $\mu$ m.

Fuente: Simmons (2007).

### II.2.1. Alteraciones en cítricos

Las especies de *Alternaria* producen al menos cuatro enfermedades en los cítricos: podredumbre en los frutos, mancha marrón de las mandarinas, mancha foliar en limón rugoso y mancha foliar de los cítricos. La podredumbre afecta a la columela central de la fruta y puede desarrollarse en todo tipo de cítricos. Las lesiones, no siempre evidentes, se presentan como pequeños puntos marrones o negros en la parte final del peciolo (Figura 2A). Esta enfermedad se suele desarrollar durante el almacenamiento de la fruta, apareciendo de forma esporádica en los cultivos. La mancha marrón producida por *Alternaria* spp. en las mandarinas afecta tanto al fruto como a las hojas del árbol, provocando su caída prematura. Las hojas jóvenes presentan manchas necróticas redondeadas de color marrón, rodeadas de un halo amarillo. Las manchas tienden a seguir las venas de la hoja, lo que les proporciona una forma que recuerda a un ojo (Figura 2B) (Timmer y col., 1998; Vicent y col., 2000). La mancha foliar en limón rugoso afecta solamente a este tipo de limones y a la variedad de lima Rangpur. Las lesiones foliares son muy similares a las manchas marrones de las mandarinas (Timmer y col., 2000). Por último, la mancha foliar de los cítricos es una enfermedad que afecta principalmente a la lima mejicana, provocando pequeñas coloraciones que desaparecen cuando la fruta madura. La mancha foliar también se produce en pomelos, naranjas de ombligo y limas de Tahití, causando en raras ocasiones daños significativos.

Las especies responsables de estas enfermedades en cítricos incluyen *A. alternata*, *A. citri* y *A. limicola*. En el caso de las tres primeras enfermedades descritas, se determinó la presencia de cepas de *A. alternata* y *A. citri* en las muestras analizadas (Timmer y col., 2000; Isshiki y col., 2003). Sin embargo, los estudios genéticos llevados a cabo por Peever y col. (2005) no demostraron diferencias genéticas significativas entre las cepas de *Alternaria* aisladas, por lo que se consideró a *A. alternata* como la especie responsable de dichas alteraciones en los cítricos. Por el contrario, en las frutas afectadas por la mancha foliar de los cítricos solamente se han aislado cepas de *A. limicola* (Becerra y col., 1988; Timmer y col., 2000, 2003).

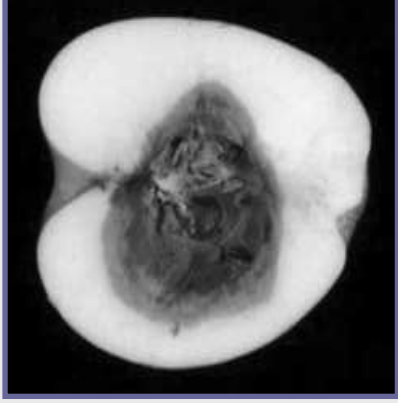
### II.2.2. Alteraciones en rosáceas

La podredumbre provocada por *A. mali* es una enfermedad grave que afecta a los manzanos. Las lesiones aparecen en las hojas al final de la primavera o comienzos del verano en forma de manchas pequeñas, redondas y marrones, que aumentan de tamaño adquiriendo una forma de ojo de rana (Figura 2C). Cuando las lesiones se producen en los peciolos, las hojas se vuelven amarillas y se puede producir hasta un 50 % de defoliación en los árboles no tratados con fungicidas. Por el contrario, las lesiones no son frecuentes en los frutos (Jones y Aldwinckle, 2002; Rollemberg y col., 2011).

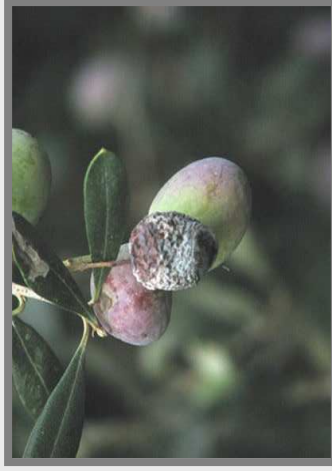
*A. alternata* y *A. tenuissima* ocasionan la podredumbre de las manzanas (Figura 2D). La infección puede ocurrir tanto antes como después de la recolección, y se caracteriza por el crecimiento fúngico en los lóbulos donde se alojan las semillas. En el árbol,

**A****B**

### Cítricos

**C****D****E**

### Rosáceas

**F**

### Aceitunas

**G**

### Frutos secos

**H**

### Leguminosas

**Figura 2.** Principales alteraciones ocasionadas por *Alternaria* spp. en cultivos vegetales (I). Podredumbre de la naranja (A), mancha marrón del mandarino (B), mancha foliar del manzano (C), podredumbre de las manzanas (D), podredumbre de las peras (E), podredumbre de las aceitunas (F), tizón tardío del pis-tacho (G) y tizón de las vainas del guisante (H).



la colonización se produce a través de lesiones en el fruto, que puede oscurecerse y caer prematuramente. Sin embargo, tras la recolección el hongo penetra en los frutos cuando se sumergen en agua contaminada en las naves de empaquetado (Jones y Aldwinckle, 2002; Niem y col., 2007).

*A. alternata* también afecta a los perales, principalmente a las variedades Nijisseiki y Ya Li, procedentes de Japón y China, respectivamente. La enfermedad se desarrolla principalmente en hojas y frutos. Las lesiones aparecen primero en forma de pequeñas manchas negras en las hojas, que caen prematuramente en casos de infecciones severas. En los frutos, las lesiones son mayores, produciendo su agrietamiento y el desprendimiento del árbol (Figura 2E) (Jones y Aldwinckle, 2002).

### II.2.3. Alteraciones en aceitunas

Las aceitunas dañadas por cualquier causa (agentes meteorológicos, insectos, recolección, atrojado, etc.) están expuestas a ser colonizadas por *A. alternata*. La proliferación del moho se caracteriza por la formación de podredumbres secas y negras en aceitunas maduras o en proceso de maduración (Figura 2F). Las lesiones varían en función de la procedencia de la aceituna, siendo mayores en aceitunas recolectadas del suelo (Logrieco y col., 2003). Además, cuando se produce un desfase entre la recolección y la molturación en las almazaras, las condiciones de temperatura y humedad elevadas que se producen durante el almacenamiento, favorecen el desarrollo del moho (Barranco y col., 2004).

### II.2.4. Alteraciones en frutos secos

El cultivo de pistacho se ve afectado por el tizón tardío causado por *A. alternata*, *A. arborescens* y *A. tenuissima*, que alteran tanto las hojas como los frutos. En las hojas, la infección se presenta, generalmente en primavera y verano, en forma de pequeñas manchas redondeadas, con el centro negro y rodeadas de un halo amarillo preferentemente en el envés de la hoja. Al comienzo de la maduración de los frutos, se desarrollan las manchas foliares colonizando casi toda la superficie de las hojas y produciéndose incluso la defoliación completa del árbol cuando las condiciones ambientales son óptimas (Figura 2G). Sobre el fruto, la enfermedad se caracteriza por el desarrollo de pequeñas manchas necróticas en la cáscara del fruto inmaduro. Cuando el fruto se desarrolla, las lesiones invaden la parte interna de la cáscara y llegan hasta el fruto seco, donde ocasiona coloraciones no deseadas que reducen su calidad (Pryor y Michailides, 2002). Otros frutos secos en los que se ha detectado esta enfermedad son las almendras, nueces y avellanas. En el caso de las almendras, *Alternaria* spp. afecta principalmente a las hojas, provocando con frecuencia el secado completo. Sin embargo, en el caso de las nueces y avellanas, provoca la caída prematura de los frutos, llegando a perderse hasta un 30 % de la producción (Hong y col., 2006; Luo y col., 2007).

### II.2.5. Alteraciones en leguminosas

El tizón en leguminosas se ha descrito en cultivos de soja, guisantes, judías, garbanzos y cacahuetes. La infección puede producirse durante todas las etapas del de-

sarrollo de la planta, aunque hay una mayor incidencia durante la senescencia de los cultivos (Chen y col., 2011). Las lesiones en las hojas comienzan como pequeñas manchas marrones de tamaño irregular, que se unen para formar áreas necróticas, provocando en ocasiones la defoliación completa de la planta. En las vainas y semillas se produce un oscurecimiento de la superficie debido al desarrollo del micelio (Figura 2H). *A. alternata* es la principal especie relacionada con el tizón en leguminosas, sin embargo, también se ha descrito la presencia de *A. tenuissima*, *A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. brasiliensis* y *A. arachidis* (Hagedorn e Inglis, 1986; Hartman y col., 1999; Queiroz y col., 2000; Chen y col., 2011).

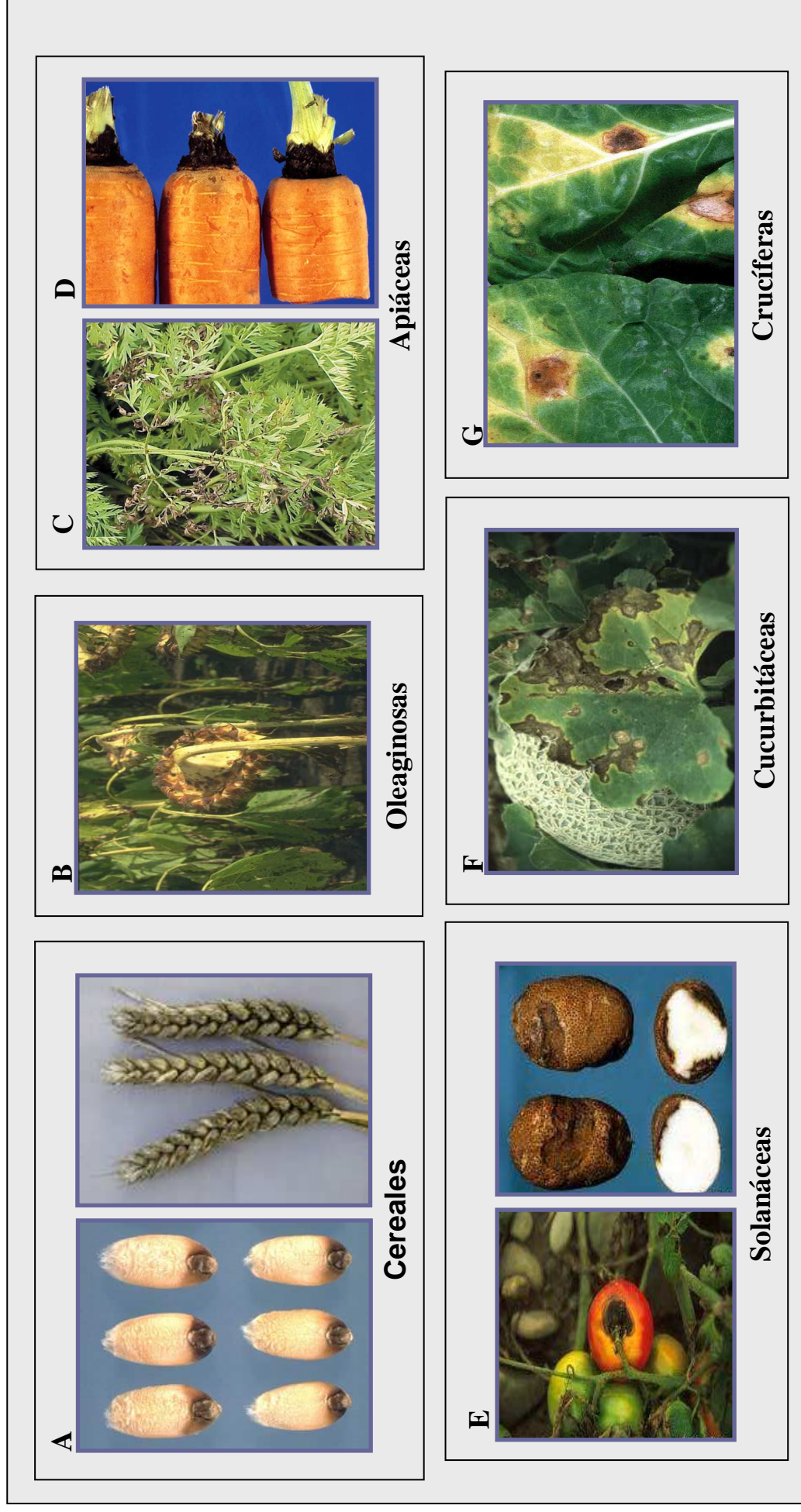
#### II.2.6. Alteraciones en cereales

En los cultivos de cereales, los granos colonizados por especies de *Alternaria* adquieren coloraciones pardas o negras en la zona del germen que, en casos severos, puede extenderse al área circundante y al surco e incluso afectar a toda la superficie de las espigas (Figura 3A) (Murray y col., 2008). El riego, las lluvias frecuentes, las bajas temperaturas y heladas durante la maduración, provocan una demora en el secado de los granos en el campo, favoreciendo así la colonización por *Alternaria* spp., y su posterior proliferación durante el almacenamiento. La presencia de estas alteraciones disminuye la calidad tecnológica de los granos de cereales, provocando graves pérdidas económicas en el sector al no poderse procesar para la elaboración de derivados (Fernández y col., 2000; Logrieco y col., 2009). Estas alteraciones se han descrito con frecuencia

en granos de trigo, cebada y avena, y con una incidencia menor en arroz y maíz (Logrieco y col., 1990; Clear y col., 2000a, b; Rohacik y Hudec, 2007; Azcarate y col., 2008). Las especies causantes de esta alteración incluyen *A. alternata*, *A. triticina*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. infectoria* y *A. japonica*, aunque también se han aislado especies fúngicas de géneros como *Bipolaris* y *Cladosporium* (Häggblom y col., 2007; Murray y col., 2008; Perelló y col., 2008; Bensassi y col., 2009; Fernández y Holzgang, 2009).

#### II.2.7. Alteraciones en oleaginosas

Los cultivos de oleaginosas están ampliamente difundidos por el mundo y se caracterizan por su gran adaptabilidad a distintas áreas. La mancha foliar, ocasionada por *A. helianthi*, *A. alternata*, *A. macrospora* o *A. japonica*, es una enfermedad grave descrita en girasol, algodón, linaza, colza y sésamo, ya que su producción puede verse reducida hasta un 80 % (Rimmer y col., 2007). La enfermedad se manifiesta como manchas en tallos, peciolo y hojas (Figura 3B). Las lesiones en peciolo y tallos empiezan como puntos oscuros, que aumentan de tamaño formando lesiones alargadas y estrechas, que provocan la rotura de los tallos. Los síntomas foliares comienzan como pequeñas manchas oscuras de tamaño irregular, que se unen hasta provocar la defoliación completa de la planta. Esta defoliación prematura produce una disminución en el área foliar activa, y por lo tanto, una disminución en la calidad de las semillas (Lagopodi y Thanassouloupoulos, 1998; Rothrock y Kirkpatrick, 2001; Prasad y col., 2009).



**Figura 3.** Principales alteraciones ocasionadas por *Alternaria* spp. en cultivos vegetales (II): Puntos negros en trigo (A), mancha foliar del girasol (B), quemadura foliar de las zanahorias (C), podredumbre de las zanahorias (D), tizón temprano del tomate y la patata (E), marchitez foliar del melón (F) y tizón negro del repollo (G).

### II.2.8. Alteraciones en apiáceas

Zanahoria, perejil, chirivía, apio e hinojo son los cultivos de apiáceas más afectados por infecciones de *Alternaria* spp. El tizón de las hojas en los cultivos de apiáceas se caracteriza por la presencia de pequeñas manchas oscuras que confluyen cuando se desarrolla la enfermedad y desembocan en el secado completo de la planta (Figura 3C). *A. dauci* y *A. petroselini* se han descrito como las especies responsables del tizón en zanahorias y perejil, respectivamente (Cunnington y col., 2007; Boedo y col., 2010). Sin embargo, en el caso del apio, chirivía e hinojo se han aislado varias especies de *Alternaria* (Farrar y col., 2004).

Por otra parte, *A. radicina* es responsable de la podredumbre negra de la raíz y la corona de las zanahorias, que se desarrolla incluso durante el almacenamiento en refrigeración, provocando cuantiosas pérdidas económicas en el sector (Figura 3D) (Groot y col., 2004; Park y col., 2008). Tanto *A. dauci* como *A. radicina* pueden infectar las semillas de zanahoria, evitando su germinación cuando la contaminación es severa, o provocando el marchitamiento fúngico en las 2 - 3 semanas posteriores a la germinación (Favis y Raid, 2002; Farrar y col., 2004).

### II.2.9. Alteraciones en solanáceas

El tizón temprano es una de las principales enfermedades que afectan al rendimiento de cultivos de tomate y patata. Es una enfermedad de distribución mundial, pero su incidencia es mayor en regiones cálidas y húmedas, donde el rocío es frecuente y proporciona la humedad necesaria para el desarrollo del moho (Foolad y col.,

2008; Escuredo y col., 2011; Patel y col., 2011). El tizón temprano se desarrolla en cultivos de tomate y patata infectados por *A. solani*, aunque en el caso del tomate también puede estar producido por *A. tomatophila*. Es una enfermedad típica de la senescencia, por lo que las primeras alteraciones se observan en las hojas inferiores, y aparecen en forma de pequeñas manchas circulares de color café frecuentemente rodeadas de un halo amarillo (Alonso, 2008; Kumar y col., 2008). A medida que la enfermedad progresa, el hongo ataca a los tallos y frutos, desarrollándose lesiones similares a las producidas en las hojas (Figura 3E). Con condiciones climáticas favorables, se produce un amarillamiento anticipado e intensa defoliación, provocando el marchitamiento fúngico de la planta y reducciones superiores al 75 % en el rendimiento de las cosechas (Basu, 1974; Datar y Mayee, 1985; Sherf y MacNab, 1986; Chaerani y Voorrips, 2006; Leiminger y Hausladen, 2012).

*Alternaria* spp. también produce alteraciones en los frutos de tomate, pimiento y berenjena, causando considerables pérdidas económicas en las industrias de transformación de hortalizas (Bottalico y Logrieco, 1998; Pose y col., 2004). La infección de los frutos se produce habitualmente a través de lesiones causadas por los insectos o condiciones ambientales adversas, donde se desarrollan manchas circulares, de coloraciones pardo-oscuras o casi negras, ligeramente deprimidas y recubiertas de numerosas esporas (Pearson y Hall, 1975; Logrieco y col., 2009). Sin embargo, la infección también puede producirse bajo los sépalos o por orificios resultantes de un mal cierre estilar,

colonizando los tejidos internos sin provocar una alteración externa aparente. Las lesiones aparecen después de la recolección, cuando el desarrollo del moho provoca la podredumbre completa del fruto. Además, *Alternaria* spp. puede seguir colonizando y alterando los frutos durante el transporte y almacenamiento a temperaturas de refrigeración (Halfon-Meiri y Rylski, 1983; Morris y col., 2000; Nuez y col., 2003). La principal especie causante de estas alteraciones es *A. alternata*, aunque también se han aislado especies pertenecientes a los grupos de *A. tenuissima* y *A. arborescens* (Barkai-Golan y Paster, 2008; Andrés y col., 2010).

Otra enfermedad que afecta el cultivo de la patata y la berenjena, es la mancha foliar ocasionada por *A. alternata*. En este caso, afecta solamente a las hojas de la planta, en las que provoca lesiones pequeñas y oscuras, pudiendo ser muy numerosas. La mancha foliar tiene una menor incidencia y es menos agresiva que el tizón temprano, por lo que las pérdidas son mucho menores (Raja y col., 2006; Tymon y Johnson, 2011).

#### **II.2.10. Alteraciones en cucurbitáceas**

En las cucurbitáceas se han descrito dos tipos de enfermedades causadas por especies de *Alternaria*: el tizón y la mancha foliar, provocadas por *A. cucumerina* y *A. alternata* f. sp. *cucurbitae*, respectivamente. El tizón afecta sobre todo a los cultivos de melones y sandías, pero también se desarrolla en pepinos y calabazas. La infección se produce a través de los estomas o heridas foliares dando lugar a pequeñas manchas de

color crema que tornan a marrón oscuro cuando se desarrolla la enfermedad y se produce el secado completo de las hojas (Figura 3F). Esta enfermedad provoca un descenso en la producción, debido a que se disminuye la cantidad y calidad de los frutos maduros, los cuales también pueden verse afectados (Latin y col., 1994; Andrés y col., 2010).

La mancha foliar, provocada por *A. alternata* f. sp. *cucurbitae*, se describió por primera vez en Grecia en cultivos de pepino en invernadero, causando considerables pérdidas económicas. Además, se ha detectado en cultivos de calabacín, melón y sandía (Vakalounakis, 1990; Zhou y Everts, 2008; Andrés y col., 2010). Las alteraciones que presentan los cultivos son similares a las ocasionadas por el tizón, llegando a defoliar-se completamente las plantas afectadas.

#### **II.2.11. Alteraciones en crucíferas**

Los cultivos de coliflor, repollo, col de Bruselas, colza, brócoli, rábano, nabo, rúcula y mostaza se ven afectados por la mancha negra ocasionada por *A. brassicae*, *A. brassicicola* y *A. japonica*. La especie más dañina y extendida es *A. brassicicola*, especialmente sobre la coliflor. La infección de los cultivos puede producirse a través de las semillas, ocasionando la caída prematura de las plántulas (Reis y Boiteux, 2010). En plantas adultas, los síntomas más característicos consisten en lesiones de color negro o marrón extendidas por toda la superficie de las hojas (Figura 3G). El tizón también puede afectar a las inflorescencias (Kohl y col., 2011; Lin y col., 2011).

### II.2.12. Alteraciones en otros cultivos

*Alternaria* spp. también ocasiona enfermedades en otros cultivos frutales (melocotón, albaricoque, ciruela, cereza, aguacate, kaki, uva, higo, mango y fresa), hortalizas (ajo cebolla y escarola), y cultivos herbáceos (lúpulo y té). En la Tabla 1 se muestran las especies de *Alternaria* y las alteraciones causadas en estos cultivos.

### II.3. MICOTOXINAS PRODUCIDAS POR EL GÉNERO *ALTERNARIA*

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular ( $P_m < 700$  kDa) producidos por determinadas especies fúngicas al final de la fase exponencial de crecimiento y durante la fase estacionaria. La ingestión, inhalación o absorción cutánea de estos compuestos provoca efectos adversos en la salud de animales y personas. Las micotoxinas pueden contaminar los alimentos, los piensos o las materias primas utilizadas para su elaboración, originando un grupo de enfermedades o trastornos, denominados micotoxicosis (Bennett y Klich, 2003; Frisvad y col., 2007; Soriano, 2007).

Las especies del género *Alternaria* sintetizan más de 70 metabolitos secundarios tóxicos para las plantas (fitotoxinas), pero solo una pequeña parte de ellos se han caracterizado químicamente e identificado como compuestos tóxicos para personas y animales, por lo que se consideran micotoxinas (Tabla 2) (Barkai-Golan, 2008; Ostry, 2008; EFSA, 2011). Atendiendo a sus efectos sobre las plantas, las toxinas de *Alternaria* spp. se agrupan en toxinas no específicas de hospedador y toxinas específicas de hospedador. Las toxinas no específicas de hos-

pedador afectan a una amplia variedad de especies vegetales, aunque en muchos casos su modo de acción no se ha identificado. Sin embargo, si se ha determinado la actividad fitotóxica de toxinas como el zinniol, el TeA y la tentoxina (TEN). El TeA inhibe la síntesis proteica, mientras que el zinniol afecta a la permeabilización de la membrana y la TEN inhibe la fosforilación debido a que se une a la cloroplasto ATP sintetasa (Thomma, 2003). Además, algunas de estas toxinas no específicas como el AOH, AME, ALT, TeA y ATX se han relacionado con la aparición de enfermedades en personas y animales (EFSA, 2011).

Las toxinas específicas de hospedador afectan a un menor número de especies vegetales. Por lo general, causan alteraciones severas en determinadas plantas donde se desarrolla la especie de *Alternaria* productora de estas toxinas. Aunque se han determinado los mecanismos de acción de algunas toxinas específicas de hospedador, como las AAL toxinas, ya que desempeñan un papel crucial en la patogenicidad de la especie que colonizan, todavía existen pocos estudios sobre su toxicidad en animales (Barkai-Golan, 2008).

El estudio de la síntesis de micotoxinas se realiza mediante el cultivo de las especies productoras en condiciones y medios de cultivo óptimos. Sin embargo, para que se produzcan las micotoxinas, además de la presencia de la especie productora, influyen las condiciones ambientales y la composición del sustrato. En la Tabla 2 se muestran las especies productoras de las principales toxinas de *Alternaria* spp. descritas. Toxinas

**Tabla 1.** Alteraciones ocasionadas por *Alternaria* spp. en diferentes cultivos vegetales.

Cultivo	Alteración	Especie causante	Referencias
Melocotón, albaricoque, ciruela, cereza, aguacate y kaki	Podredumbre del fruto	<i>A. alternata</i>	Snowdon (1990); Ogawa y col. (1995)
Uvas	Podredumbre del racimo	<i>A. alternata</i>	Pearson y Goheen (1988); Snowdon (1990)
Fresa	Podredumbre del fruto	<i>A. alternata</i> , <i>A. tenuissima</i>	Snowdon (1990); Maas (1998)
	Mancha foliar	<i>A. alternata</i> f. sp. <i>fragariae</i>	Maas (1998)
Higos	Marchitez fúngica	<i>A. alternata</i>	Doster y Michailides (2007)
Mango y papaya	Tizón en fruto y hojas	<i>A. alternata</i>	Snowdon (1990); Ploetz y col. (1994)
Cebolla y ajo	Mancha púrpura	<i>A. porri</i>	Schwartz y Mohan (2008)
Escarola	Mancha foliar	<i>A. cichorii</i>	Barreto y col. (2008)
Lúpulo	Tizón	<i>A. humuli</i>	Simmons (2007)
Té	Tizón	<i>A. alternata</i>	Chakraborty y col. (2006)

**Tabla 2.** Toxinas producidas por las principales especies toxigénicas del género *Alternaria*.

Especie	Toxina <sup>a</sup>
<i>Alternaria alternata</i>	AOH, AME, ALT, Altenusina, ATX-I, ATX-II, ATX-III, TEN, AAL toxinas, AS toxina, AF toxina, ACR toxina, ACT toxina
<i>A. arborescens</i>	AOH, AME, ALT, ATX-I, TeA
<i>A. brassicae</i>	AOH, AME, TeA
<i>A. brassicicola</i>	AOH, AME, TeA, ATX-I
<i>A. citri</i>	AOH, AME, ALT, TeA
<i>A. cucumerina</i>	AOH, AME, Macrosporina
<i>A. dauci</i>	AOH, AME, Macrosporina, Zinniol
<i>A. gaisen</i>	AOH, AME, ALT, Altenusina, TeA, ATX-I
<i>A. infectoria</i>	Infectopironas, Novae-zelandinas
<i>A. longipes</i>	AME, TeA, ATX-I
<i>A. mali</i>	TeA, ATX-I, ATX-II, ATX-III, TEN, AM-toxina
<i>A. porri</i>	AOH, AME, ALT, TeA, Altersolanol, TEN, Macrosporina, Zinniol
<i>A. radicina</i>	ALT, TeA, ATX-I, Radicinina, Radicinol
<i>A. solani</i>	AOH, AME, Altersolanol, Macrosporina, Zinniol
<i>A. tenuissima</i>	AOH, AME, ALT, TeA, ATX-I, TEN

<sup>a</sup> AOH: alternariol; AME: alternariol monometil éter; ALT:altenueno; TeA: ácido tenuazónico; ATX: altertoxina; TEN: tentoxina



como el AOH, AME, ALT, TeA, ATX, TEN o altenusina pueden sintetizarlas diferentes especies del género (Andersen y col., 2001, 2002). Por el contrario, otras toxinas como el altersolanol, la macrosporina o el zinniol, solo las producen las especies del grupo de *A. porri*, al que pertenecen *A. porri*, *A. dauci*, *A. solani* y *A. cucumerina* (Andersen y col., 2008; Phuwapraisirisan y col., 2009), mientras que las especies englobadas en el grupo de *A. infectoria* son las únicas productoras de infectopironas y novae-zelandinas (Christensen y col., 2005; Andersen y col., 2009). Por último, existen toxinas que solo las sintetizan determinadas cepas patógenas. En ese grupo se incluyen las AAL toxinas (*A. alternata* f. sp. *lycopersici*), AS toxina (*A. alternata* patotipo del girasol), AF toxina (*A. alternata* f. sp. *fragariae*), ACR toxina (*A. alternata* patotipo del limón rugoso) y ACT toxina (*A. alternata* patotipo de las mandarinas). La AK toxina y la AM toxina se han detectado en peras y manzanas contaminadas con cepas patógenas de *A. gaisen* y *A. mali*, respectivamente (Montemurro y Visconti, 1992; Thomma, 2003; Xu y Du, 2006). Sin embargo, no todas las cepas pertenecientes a estos grupos producen siempre dichas toxinas, ya que la síntesis está determinada por las condiciones ambientales en que se desarrolla el moho.

Las especies de *Alternaria* pueden producir micotoxinas en intervalos de temperatura muy amplios, pero siempre con actividades de agua superiores a 0,90. Young y col. (1980) determinaron que la máxima producción de TeA en semillas de algodón inoculadas con *A. tenuissima* tiene lugar a 20 °C y con un 37,5 % de humedad del gra-

no. Magan y Lacey (1984) identificaron una producción máxima de AOH, AME y ALT en granos de trigo contaminados con *A. alternata* a 25 °C y 0,98  $a_w$ , mientras que en pulpa de tomate contaminada con varias especies de *Alternaria*, las condiciones óptimas para la producción de AOH, AME y TeA identificadas por Pose y col. (2010) fueron de 21 °C/0,954  $a_w$ , 35 °C/0,954  $a_w$  y 21 °C/0,982  $a_w$ , respectivamente. Por último, Oviedo y col. (2011), observaron máximos de producción de AOH y AME a 0,98  $a_w$ , aunque la temperatura óptima dependía de la cepa de *A. alternata* que inoculaban en granos de soja irradiados.

Diversos estudios demuestran que la composición del sustrato en el que se desarrolla el moho influye en la producción de micotoxinas. En este sentido, se ha descrito el efecto estimulante de determinados compuestos nitrogenados como la fenilalanina en la producción de AOH y AME. También se ha observado el efecto inhibitor de determinados monosacáridos, disacáridos y polisacáridos en la producción de AME (Brzonkalik y col., 2011).

### II.3.1. Propiedades físicas y químicas de las micotoxinas de *Alternaria* spp.

Las toxinas de *Alternaria* spp. se clasifican en cinco grupos atendiendo a sus estructuras químicas:

- Dibenzo- $\alpha$ -pironas: AOH, AME y ALT
- Perileno quinonas: ATX-I, -II, -III
- Ácidos tetrámicos: TeA
- AAL-Toxinas: AAL-TA1, AAL-TA2, AAL-TB1, AAL-TB2

- Otras estructuras: TEN

En la Tabla 3 y las Figuras 4 y 5 se muestran las propiedades y estructuras químicas de las principales toxinas de *Alternaria* spp. Estas micotoxinas se aislaron, caracterizaron e identificaron entre los años 1953 y 1986 (Ostry, 2008). El estudio de las rutas de biosíntesis y el metabolismo del AOH, AME y ALT, demostró que se pueden conjugar con otras moléculas más polares como la glucosa, aminoácidos y sulfatos, presentes en los sustratos vegetales donde se producen. La formación de conjugados en los alimentos dificulta el desarrollo de métodos analíticos para su detección, debido a los cambios de polaridad que presentan respecto a las micotoxinas precursoras (Berthiller y col., 2005; Koch y col., 2005; Altemöller y col., 2006). En cuanto al metabolismo de las toxinas, la hidroxilación del AOH, AME y el ALT y su conjugación con el ácido glucurónico y sulfatos se ha demostrado en estudios *in vitro*. Sin embargo, no se dispone de datos suficientes sobre la absorción, la distribución y excreción de las toxinas de *Alternaria* spp. en personas y animales.

### II.3.2. Toxicidad de las micotoxinas producidas por *Alternaria* spp.

La exposición a las toxinas de *Alternaria* spp. se ha relacionado con la aparición de una gran variedad de efectos adversos en la salud de personas y animales. Determinados cultivos de *Alternaria* spp. son tóxicos en ratas, embriones de pollo y cultivos celulares humanos, y también son teratogénicos y fetotóxicos en ratones (Pero y col., 1973; Harvan y Pero, 1976; Sauer y col., 1978; Griffin y Chu, 1983; Schwarz y col., 2012).

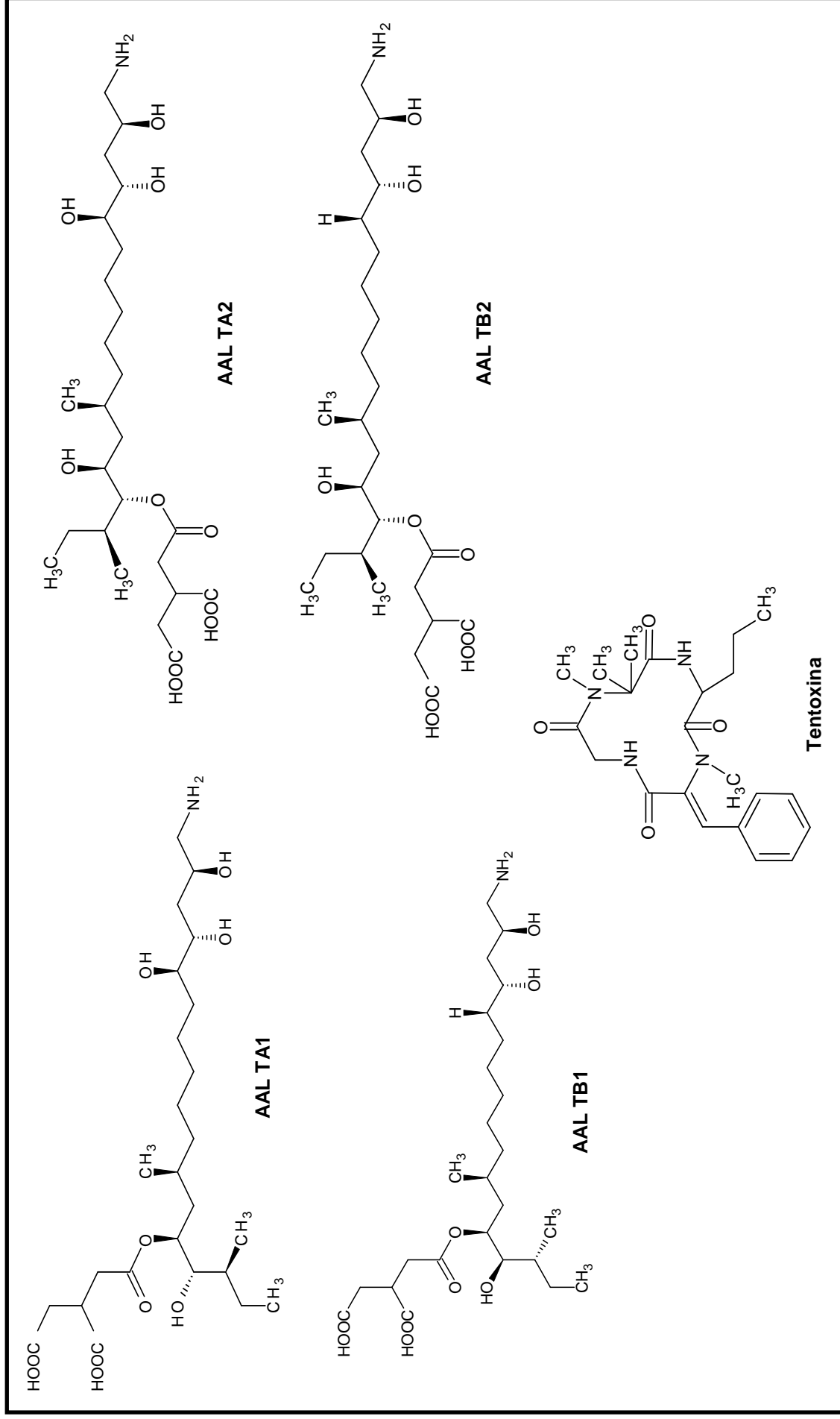
Además, los extractos de cultivos de *A. alternata* son mutagénicos en varios sistemas *in vitro* y cancerígenos en ratas alimentadas con piensos contaminados (Scott y Stoltz, 1980; Liu y col., 1991; Combina y col., 1999; Schrader y col., 2001). Por otra parte, Liu y col. (1992) relacionaron el consumo de alimentos contaminados con *A. alternata* con una elevada incidencia de cáncer de esófago. Los efectos tóxicos que los cultivos de *Alternaria* spp. producen en los diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* son muy variables, ya que dependen del tipo de micotoxinas sintetizadas (Tabla 4).

#### Dibenzo- $\alpha$ -pironas

AOH y AME son mutagénicos, genotóxicos, carcinogénicos y citotóxicos en cultivos celulares animales y bacterianos. Presentan una actividad mutagénica elevada tanto en cultivos de *Bacillus subtilis* (Kada y col., 1984), como de *Escherichia coli* (An y col., 1989; Zhen y col., 1991), y baja en cultivos de *Salmonella Typhimurium* (Scott y Stoltz, 1980; Davis y Stack, 1994). Los estudios de genotoxicidad demuestran que el AOH tiene mayor actividad que el AME (Liu y col., 1991; Xu y col., 1996; Lehmann y col., 2006; Marko, 2007; Pfeiffer y col., 2007; Solhaug y col., 2012). En cuanto al poder carcinogénico de estas micotoxinas, no existen estudios exhaustivos en animales. Sin embargo, en ratones alimentados con 50 - 100 mg de AME por kg de peso durante 10 meses, se desarrollaron alteraciones precancerosas en la mucosa esofágica (Yekeler y col., 2001). Por otra parte, los estudios de toxicidad del ALT en larvas de camarón (*Artemia salina*) en salmuera, pusieron de

<b>Dibenzo-<math>\alpha</math>-pironas</b>	<div data-bbox="199 1281 459 1774"> </div> <div data-bbox="486 1460 518 1601">Alternariol</div> <div data-bbox="199 721 459 1272"> </div> <div data-bbox="486 833 518 1169">Alternariol monometil éter</div> <div data-bbox="167 116 459 645"> </div> <div data-bbox="486 264 518 398">Altenueno</div>
<b>Perileno quinonas</b>	<div data-bbox="566 1384 842 1818"> </div> <div data-bbox="861 1534 893 1691">Altertoxina I</div> <div data-bbox="542 743 853 1182"> </div> <div data-bbox="861 900 893 1064">Altertoxina II</div> <div data-bbox="550 152 837 555"> </div> <div data-bbox="861 286 893 459">Altertoxina III</div>
<b>Aldos tetrármicos</b>	<div data-bbox="917 801 1225 1303"> </div> <div data-bbox="1252 891 1284 1131">Ácido tenuazónico</div>

**Figura 4.** Estructura química del alternariol, alternariol monometil éter, altenueno, altertoxinas I, II y III y ácido tenuazónico.



**Figura 5.** Estructura química de las AAL toxinas y la tentoxina.

**Tabla 3.** Propiedades bioquímicas de las principales micotoxinas producidas por *Alternaria* spp.

Toxina	Nombre bioquímico	Nº CAS	Pm (Da)	Fórmula
Alternariol (AOH)	3,7,9-Trihidroxi-1-metil-6 <i>H</i> -dibenzo[ <i>b,d</i> ]piran-6-ona	641-38-3	258	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
Alternariol monometil éter (AME)	3,7-Dihidroxi-9-metoxi-1-metil-6 <i>H</i> -dibenzo[ <i>b,d</i> ]piran-6-ona	23452-05-3	272	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
Altenueno (ALT)	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>aR</i> )-rel-2,3,4,4 <i>a</i> -Tetrahidro-2,3,7-trihidroxi-9-metoxi-4 <i>a</i> -metil-6 <i>H</i> -dibenzo[ <i>b,d</i> ]piran-6-ona	29752-43-0	292	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>
Altertoxina I (ATX-I)	(1 <i>S</i> ,12 <i>aR</i> ,12 <i>bS</i> )-1,2,11,12,12 <i>a</i> ,12 <i>b</i> -Hexahidro-1,4,9,12 <i>a</i> - tetrahidroxi-3,10-perilenodiona	56258-32-3	352	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>
Altertoxina II (ATX-II)	(7 <i>aR</i> ,8 <i>aR</i> ,8 <i>bS</i> ,8 <i>cR</i> )-7 <i>a</i> ,8 <i>a</i> ,8 <i>b</i> ,8 <i>c</i> ,9,10-Hexahidro-1,6,8 <i>c</i> -trihidroxi-perilo[1,2- <i>b</i> ]oxireno-7,11-diona	56257-59-1	350	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
Altertoxina III (ATX-III)	(1 <i>aR</i> ,1 <i>bS</i> ,5 <i>aR</i> ,6 <i>aR</i> ,6 <i>bS</i> ,10 <i>aR</i> )-1 <i>a</i> ,1 <i>b</i> ,5 <i>a</i> ,6 <i>a</i> ,6 <i>b</i> ,10 <i>a</i> -Hexahidro-4,9-dihidroxi-perilo[1,2- <i>b</i> :7,8- <i>b'</i> ]bisoxireno-5,10-diona	105579-74-6	348	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
Ácido tenuazónico (TeA)	(5 <i>S</i> )-3-Acetil-1,5-dihidro-4-hidroxi-5-[(1 <i>S</i> )-1-etilpropil]-2 <i>H</i> -pirrol-2-ona	610-88-8	197	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> N
Tentoxina (TEN)	Ciclo[ <i>N</i> -metil-L-alanil-L-leucil-( $\alpha$ <i>Z</i> )- $\alpha$ , $\beta$ -didehidro- <i>N</i> -metilfenilalanilglicilo]	28540-82-1	414	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub> N <sub>4</sub>

**Tabla 3.** (continuación)

Toxina	Nombre bioquímico	Nº CAS	Pm (Da)	Fórmula
AAL TA1 toxina	Ácido (2 <i>R</i> )-1,2,3-Propanotricarboxílico, Éster 1-[(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,12 <i>S</i> )-13-amino-9,10,12-trihidroxi-1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )-1-hidroxi-2-metilbutil]-3-metiltridecilo]	79367-52-5	521	C <sub>25</sub> H <sub>47</sub> O <sub>10</sub> N
AAL TA2 toxina	Ácido (2 <i>R</i> )-1,2,3-Propanotricarboxílico, Éster 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>S</i> ,13 <i>S</i> )-14-amino-2,10,11,13-tetrahidroxi-4-metil-1-[(1 <i>R</i> )-1-metilpropil]tetradecilo]	79367-51-4	521	C <sub>25</sub> H <sub>47</sub> O <sub>10</sub> N
AAL TB1 toxina	Ácido (2 <i>R</i> )-1,2,3-Propanotricarboxílico, Éster 1-[(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,12 <i>S</i> )-13-amino-10,12-dihidroxi-1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )-1-hidroxi-2-metilbutil]-3-metiltridecilo]	176590-32-2	505	C <sub>25</sub> H <sub>47</sub> O <sub>9</sub> N
AAL TB2 toxina	Ácido (2 <i>R</i> )-1,2,3-Propanotricarboxílico, Éster 1-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,11 <i>R</i> ,13 <i>S</i> )-14-amino-2,11,13-trihidroxi-4-metil-1-[(1 <i>R</i> )-1-metilpropil]tetradecilo]	176705-51-4	505	C <sub>25</sub> H <sub>47</sub> O <sub>9</sub> N

**Nº CAS:** Chemical Abstracts Services Registry Number; **Pm:** Peso Molecular

**Tabla 4.** Principales efectos tóxicos provocados por las micotoxinas de *Alternaria* spp.

Micotoxina	Efectos tóxicos	Referencias
AOH	Actividad mutagénica en cultivos bacterianos	Scott y Stoltz (1980); Kada y col. (1984); Zhen y col. (1991); Davis y Stack (1994)
	Actividad genotóxica en cultivos animales	Liu y col. (1991); Xu y col. (1996); Lehmann y col. (2006); Marko (2007); Pfeiffer y col. (2007); Solhaug y col. (2012)
	Actividad citotóxica en cultivos de camarón ( <i>Artemia salina</i> )	Panigrahi y Dallin (1994)
AME	Actividad mutagénica en cultivos bacterianos	Scott y Stoltz (1980); Kada y col. (1984); Zhen y col. (1991); Davis y Stack (1994)
	Actividad genotóxica en cultivos animales	Liu y col. (1991); Marko (2007); Pfeiffer y col. (2007)
	Alteraciones precancerosas en mucosa esofágica de ratones	Yekeler y col. (2001)
	Actividad citotóxica en cultivos de camarón ( <i>Artemia salina</i> )	Panigrahi y Dallin (1994)
ALT	Actividad citotóxica en cultivos de camarón ( <i>Artemia salina</i> )	Panigrahi y Dallin (1994)
TeA	Hemorragias internas en perros y aves	Azcarate y col. (2008)
	Alteraciones precancerosas en mucosa esofágica de ratones	Yekeler y col. (2001)
	Desorden hematológico en personas (Onyalai)	Logrieco y col. (2003); Ostry (2008)
ATX	Actividad mutagénica en el test de Ames	Scott y Stoltz (1980); Stack y col. (1986); Stack y Prival (1986); Chelkowski y Visconti (1992); Schrader y col. (2001, 2006)
	Actividad genotóxica en cultivos celulares de ratón (ATX-I y ATX-III)	Osborne y col. (1988)
	Actividad mutagénica en cultivos celulares de ratón (ATX-II)	Fleck y col. (2012)

manifiesto que las dosis letales medias de ALT (375 g/mL) son muy superiores a las del TeA (75 mg/mL) y AOH (200 mg/mL) (Panigrahi y Dallin, 1994).

#### Ácido tenuazónico

La toxicidad del TeA se ha demostrado en plantas, embriones de pollo y en otras especies animales (Azcarate y col., 2008). En perros, la ingesta de dosis diarias de 10 mg/kg de peso, provocó la aparición de hemorragias en diversos órganos. En las aves domésticas, una dosis de 10 mg/kg en el pienso disminuyó tanto la eficiencia alimenticia como la ganancia de peso e incrementó las hemorragias internas en las canales. Sin embargo, no se ha demostrado efecto mutagénico del TeA en cultivos bacterianos (Scott y Stoltz, 1980; Schrader y col., 2001). Al igual que con el AME, los ratones que consumieron pienso contaminado con TeA durante 10 meses, desarrollaron alteraciones en la mucosa esofágica, pero en este caso, la dosis diaria fue de 25 mg/kg (Yekele y col., 2001). Además, el consumo de sorgo contaminado con TeA, se ha relacionado con la aparición de un desorden hematológico en personas conocido como Onyalai (Logrieco y col., 2003; Ostry, 2008).

#### Altérttoxinas

Las ATXs presentan actividad mutagénica en el test de Ames (Scott y Stoltz, 1980; Stack y col., 1986; Stack y Prival, 1986; Schrader y col., 2006). La actividad mutagénica de las ATXs (ATX-I, II, III) en ratones es superior a la del AOH y AME, siendo la ATX-III la de mayor actividad (Chelkowski y Visconti, 1992; Schrader y col., 2001; Fleck y col., 2012). El potencial

mutagénico de la ATX-III es 10 veces inferior al de la aflatoxina B<sub>1</sub>, que es la micotoxina con mayor actividad mutagénica en la especie humana (Stack y col., 1986; Stack y Prival, 1986). También se ha demostrado que la ATX-I y la ATX-III son genotóxicas en cultivos celulares de ratón (Osborne y col., 1988).

#### **II.3.3. Presencia de micotoxinas de *Alternaria* spp. en alimentos y piensos**

Las toxinas de *Alternaria* spp. se aíslan con frecuencia de una gran variedad de productos vegetales frescos y procesados (Tabla 5). La presencia de micotoxinas de *Alternaria* spp. en cereales es muy común, debido al almacenamiento de los granos en condiciones favorables para el crecimiento del moho. En este sentido, se ha detectado AOH, AME, ALT, TeA o TEN en granos de trigo, cebada, avena, centeno, arroz y maíz. El procesamiento de los granos de cereales no evita la presencia de micotoxinas, como lo demuestra el hecho de que las muestras de cereales de desayuno, harina, pasta o cerveza analizadas por diversos investigadores, contenían AOH, AME o TeA (Abd El-Aal, 1997; Aresta y col., 2003; Azcarate y col., 2008; Asam y col., 2010; Siegel y col., 2010; EFSA, 2011). También se ha detectado la presencia de AME en papillas infantiles y TeA en alimentos infantiles que contenían cereales en su composición, lo cual causa especial preocupación, ya que estos alimentos son la base fundamental de la alimentación en las primeras etapas de la vida (EFSA, 2011).

En semillas oleaginosas como la colza, girasol, sésamo y linaza también se ha



**Tabla 5.** Identidad y concentración de las micotoxinas de *Alternaria* spp. detectadas en diversos alimentos.

Alimento	Micotoxinas detectadas <sup>a</sup>	Concentración máxima (µg/kg o µg/L)	Referencias
Granos de cereales y derivados	AOH	2320	Abd el-Aal (1997)
	AME	7451	Azcarate y col. (2008)
	ALT	1480	Abd El-Aal (1997)
	TeA	8814	Azcarate y col. (2008)
	TEN	38	EFSA (2011)
Semillas oleaginosas	AOH	1800	Bottalico y Logrieco (1998)
	AME	440	EFSA (2011)
	TeA	5400	EFSA (2011)
	TEN	880	Kralova y col. (2006)
	ALT	9	EFSA (2011)
	ATX-I	80	EFSA (2011)
Aceites de semillas	AOH	18	EFSA (2011)
	AME	85	EFSA (2011)
	TeA	390	EFSA (2011)
	TEN	67	EFSA (2011)
Legumbres	AOH	290	Ostry y col. (2004)
	AME	1153	Barros y col. (2011)

**Tabla 5.** (continuación)

Alimento	Micotoxinas detectadas <sup>a</sup>	Concentración máxima (µg/kg o µg/L)	Referencias
Hortalizas y derivados	AOH	8756	Terminiello y col. (2006)
	AME	1734	Terminiello y col. (2006)
	ALT	2	Noser y col. (2011)
	TeA	4021	Terminiello y col. (2006)
	TEN	9,2	EFSA (2011)
Frutas y derivados	AOH	151	EFSA (2011)
	AME	42	EFSA (2011)
	TeA	8700	EFSA (2011)
Bebidas alcohólicas	AOH	7,59	Asam y col. (2009)
	AME	1,5	EFSA (2011)
	TeA	175	Siegel y col. (2010)
Alimentos infantiles	AME	3,3	EFSA (2011)
	TeA	1	EFSA (2011)

<sup>a</sup> Las concentraciones mínimas detectadas en todos los casos fueron de 0,01 µg/kg para el AOH y el AME, 1 µg/kg para el ALT, 2 µg/kg para el TeA y la TEN y 10 µg/kg para la ATX-I (EFSA, 2011) , excepto en el caso del AME en legumbres que fue de 16 µg/kg (Barros y col., 2011)

determinado la presencia de AOH y AME. En las semillas de colza y linaza se ha detectado además ALT y en las de girasol y sésamo TeA. La TEN solo se ha aislado a partir de semillas de girasol y la ATX-I de semillas de sésamo. Por otra parte, las mismas toxinas que contaminaban las semillas se detectaron en las muestras de aceite de semillas de girasol y sésamo (Skarkova y col., 2005; Kralova y col., 2006; EFSA, 2011). Asimismo, se ha encontrado AOH y AME en legumbres como las lentejas y la soja (Ostry y col., 2004; Barros y col., 2011).

En numerosas frutas (manzana, pera, melón, albaricoque, uvas, uvas pasas, fresa, aceituna, cítricos e higos desecados), hortalizas (tomate, pimiento y zanahoria) y tubérculos (patata) se ha puesto de manifiesto la presencia de AOH, AME, ALT, TeA y TEN (Logrieco y col., 1990; Bottalico y Logrieco, 1998; da Motta y Soares, 2001; Terminiello y col., 2006; Asam y col., 2009, 2010). El consumo directo de frutas y hortalizas con putrefacción fúngica visible es improbable. Sin embargo, no es infrecuente aislar toxinas de *Alternaria* spp. a partir de alimentos procesados como salsas de tomate, ketchup, tomates desecados, conservas, mermeladas, vino o zumos de frutas (manzana, tomate, uva y naranja) (Delgado y Gómez-Cordovés, 1998; Solfrizzo y col., 2004; Scott y col., 2006; Magnani y col., 2007; Logrieco y col., 2009; Ackermann y col., 2011; Noser y col., 2011). La presencia de micotoxinas en alimentos procesados puede ser consecuencia de la utilización de materias primas con alteraciones fúngicas cuyos síntomas afectan solo a la parte interna, como ocurre en la putrefacción de las

manzanas y los cítricos. Además, aunque se eliminen las zonas visiblemente alteradas, las toxinas de *Alternaria* spp. se pueden transferir a los tejidos circundantes (Robiglio y López, 1995). Por otra parte, las industrias transformadoras no siempre disponen de métodos eficientes para detectar y eliminar completamente las materias primas afectadas con algún grado de alteración fúngica.

La presencia de micotoxinas de *Alternaria* spp. también se ha investigado en piensos. En este sentido, se han detectado cantidades elevadas de AOH, AME, ALT, ATX-I, TeA, TEN y AAL toxinas, en granos de cereales y semillas oleaginosas destinadas a la alimentación animal. Por lo general, las muestras que contenían mayores cantidades de micotoxinas tenían contaminaciones visibles de *Alternaria* spp., posiblemente debido a las condiciones de almacenamiento de los granos y semillas en las granjas, donde la elevada temperatura y humedad favorecen el crecimiento de determinadas especies de *Alternaria* y la producción de micotoxinas (Nawaz y col., 1997; Häggblom y col., 2007; Mansfield y col., 2007; Asam y col., 2010; Barros y col., 2011).

#### **II.3.4. Exposición humana a las micotoxinas de *Alternaria* spp.**

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria ha publicado recientemente los resultados de un estudio nutricional realizado para evaluar la exposición diaria a AOH, AME, TeA y TEN en los grupos de población comprendidos entre los 18 y 65 años (EFSA, 2011). En este estudio se determinó que los niveles diarios de ingesta eran de 1,9 - 39 ng/kg de peso para el AOH, 0,8 -

4,7 ng/kg de peso para el AME, 36 - 141 ng/kg de peso para el TeA y 0,01 - 7 ng/kg de peso para la TEN. Aunque la exposición a las micotoxinas de *Alternaria* spp. no se ha estudiado en la población infantil, se estima que su ingesta es dos o tres veces mayor que en la población adulta. Las estimaciones realizadas en este estudio se han establecido teniendo en cuenta únicamente alimentos de origen vegetal, puesto que no se ha demostrado la presencia de micotoxinas de *Alternaria* spp. en alimentos de origen animal.

### II.3.5. Control y prevención de micotoxinas en alimentos

La contaminación de los alimentos con micotoxinas se produce de manera natural y su concentración puede aumentar como resultado de las condiciones ambientales o de operaciones inadecuadas de recolección, almacenamiento y elaboración de los productos alimentarios. Por ello, es necesario disponer de programas de control que eviten la contaminación con mohos toxigénicos. Asimismo, se deben aplicar medidas preventivas que minimicen el desarrollo fúngico en los alimentos, tales como el almacenamiento en condiciones idóneas de temperatura, humedad relativa y atmósfera. En este sentido, las autoridades oficiales de control de los alimentos están estableciendo programas preventivos y procedimientos para minimizar los riesgos asociados a la contaminación de los alimentos con micotoxinas. Dentro de estos programas se incluyen las buenas prácticas agrícolas (GAP: “Good Agricultural Practices”) e industriales (GMP: “Good Manufacturing Practices”) y la aplicación del

sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC).

El sistema APPCC identifica y evalúa, mediante un enfoque estructurado y sistemático, los peligros que hay que controlar para garantizar la inocuidad de los alimentos desde la granja hasta la mesa. Para llevar a cabo la aplicación efectiva del sistema APPCC con relación a los peligros derivados de la presencia de mohos toxigénicos en los alimentos, es necesario disponer de técnicas rápidas para la detección de mohos productores de micotoxinas tanto en materias primas como en alimentos elaborados. Esto permitiría adoptar las medidas necesarias para apartar de la cadena alimentaria los productos que puedan suponer un riesgo para la salud del consumidor, impidiendo de esta forma la presencia de micotoxinas en los alimentos elaborados. En este sentido es necesario contar con herramientas capaces de detectar de una forma rápida y precoz la presencia de *Alternaria* spp. en alimentos, debido especialmente a que no existe una normativa que regule los niveles máximos permitidos de las micotoxinas de *Alternaria* spp. en alimentos.

### II.4. EL GÉNERO *ALTERNARIA* COMO AGENTE CAUSAL DE ENFERMEDADES HUMANAS

Aunque el género *Alternaria* incluye principalmente especies patógenas de plantas, algunas especies también se encuentran relacionadas con la aparición de infecciones humanas. *A. alternata* y *A. tenuissima* producen la alternariosis cutánea, que se manifiesta con lesiones únicas o múltiples en forma de placas pardo-rojizas papulonodula-

res, pustulosas o ulcerocostrosas, localizadas en superficies corporales expuestas, siendo rara la diseminación sistémica. La alternariosis cutánea se considera una infección oportunista que aparece en personas inmunodeficientes, debido a que padecen síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), síndrome de Cushing, algún proceso tumoral, o que han recibido trasplantes de órganos (Romano y col., 1997; Vieira y col., 2006; Mateu-Puchades y col., 2010). Además, *A. alternata* y *A. infectoria* se han relacionado con la aparición de queratomicosis y endoftalmitis en personas que han sufrido un traumatismo o cirugía ocular (Ferrer y col., 2002, 2003; Pastor y Guarro, 2008).

La incidencia de *Alternaria* spp. en infecciones humanas no es muy elevada, ya que solo ocurre en casos de personas inmunodeficientes. Sin embargo, *Alternaria* es, junto con *Cladosporium*, uno de los principales géneros fúngicos causantes de alergias (D'Amato y col., 1997). La incidencia de personas sensibilizadas frente a alérgenos fúngicos alcanza hasta el 30 % de los pacientes analizados, aunque depende en gran medida de las condiciones geográficas y climáticas. *A. alternata* es la principal especie productora de alérgenos del género, causando reacciones cutáneas positivas en el 70 % de los pacientes alérgicos a antígenos fúngicos (Asturias y col., 2005). La fracción alérgénica producida por *A. alternata* es muy heterogénea. El Comité de Nomenclatura de Alérgenos de la OMS/IUIS ha secuenciado y aprobado diez alérgenos de esta especie (Tabla 6) (Achatz y col., 1996; de Vouge y col., 1998; Breitenbach y Simon-Nobbe, 2002; Vijay y Kurupp, 2003). El principal alérgeno

es el Alt a 1, al que reconocen los anticuerpos IgE de más del 90 % de los pacientes alérgicos a *A. alternata*. La respuesta alérgica es mayor frente a las esporas fúngicas que frente a los restos micelares u otras células fúngicas. En el caso de *Alternaria* spp., la respuesta alérgica se presenta clínicamente como reacciones asmáticas de tipo inmediato mediadas por IgE (de Vouge y col., 1998).

La abundancia relativa de conidios de *A. alternata* en el aire y su presencia en las casas con humedades convierte a este microorganismo en una fuente alérgénica importante. La exposición a esporas fúngicas se diferencia de la exposición al polen en que las cantidades de esporas fúngicas por metro cúbico son mayores que las de granos de polen. Además, la exposición es más duradera, puesto que puede durar meses, mientras que la exposición a pólenes suele durar semanas. Esta exposición intensa y prolongada a *A. alternata* se asemeja a la exposición a restos epidérmicos de animales o a los ácaros del polvo y contribuye a la cronicidad y severidad del asma en las personas sensibilizadas frente a *Alternaria* spp. (Sánchez y Bush, 2001). Por otro lado, la presencia de esporas de *Alternaria* spp. en el interior de los edificios se ha identificado como uno de los factores causantes del Síndrome del Edificio Enfermo (SEE). Se denomina así al conjunto de síntomas diversos que presentan los ocupantes de un edificio, y cuyas causas radican en el propio edificio (Roussel y col., 2008; Takigawa y col., 2009). La sintomatología relacionada con el SEE es muy variada, pudiendo llegar a ser compleja, ya que suele ser el resultado de la

combinación de distintos efectos. Los síntomas más significativos incluyen:

- Irritaciones de ojos, nariz y garganta.

- Sequedad de la piel.

- Síntomas generales: dolor de cabeza, fatiga mental, y pérdida de capacidad de memoria a corto plazo.

**Tabla 6.** Alérgenos producidos por *A. alternata* aprobados por el Comité de Nomenclatura de Alérgenos de la OMS/IUIS.

Alérgeno	Nombre bioquímico	Peso Molecular (kDa)	Nº de acceso (UniProt)
Alt a 1	Glicoproteína dimérica	29 (14,5/16)	P79085
Alt a 3	Proteína de choque térmico	70	P78983
Alt a 4	Disulfuro isomerasa	57	Q00002
Alt a 5	Proteína ribosomal P2	11	P42037
Alt a 6	Enolasa	45	Q9HDT3
Alt a 7	Proteína YCP4	22	P42058
Alt a 8	Manitol deshidrogenasa	29	P0C044
Alt a 10	Aldehído deshidrogenasa	53	P42041
Alt a 12	Proteína ácida ribosomal P1	11	P49148
Alt a 13	Glutación S-transferasa	26	Q6R4B4

## II.5. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE LAS MICOTOXINAS DE *ALTERNARIA* SPP. EN ALIMENTOS

Disponer de métodos sensibles y específicos para la determinación de micotoxinas de *Alternaria* spp. en alimentos es importante para realizar estudios de toxicidad y exposición de la población y para la verificación de los sistemas de gestión de la seguridad alimentaria como el APPCC. Entre los métodos más utilizados con este fin destacan las técnicas cromatográficas e inmunológicas.

### II.5.1. Métodos de muestreo

En el Reglamento (CE) N° 401/2006 del 23 de febrero de 2006 se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios (Comisión Europea, 2006a). Sin embargo, el Reglamento solo se refiere a la detección de aflatoxina B<sub>1</sub>, aflatoxina M<sub>1</sub>, aflatoxinas totales (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>), ocratoxina A, patulina, deoxinivalenol, zearalenona, fumonisinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, y toxinas T-2 y HT-2. La legislación recoge protocolos de muestreo para alimentos como cereales y derivados, frutos secos, cacahuetes, frutos de cáscara, hueso de albaricoque, leche y derivados lácteos, especias, café y derivados, zumos de frutas, manzana y derivados, alimentos infantiles y aceites vegetales. Actualmente, la UE no tiene establecidos límites máximos para ninguna de las micotoxinas de *Alternaria* spp. aisladas en alimentos, por lo que no se han especificado técnicas de muestreo para hortalizas como las zanahorias y los tomates, que son dos de

los alimentos con mayor incidencia de micotoxinas de *Alternaria* spp.

### II.5.2. Preparación de la muestra

Las micotoxinas presentan una distribución poco uniforme en alimentos, por lo que se requiere una cuidadosa homogeneización de la matriz antes de su extracción. Por otra parte, los alimentos son sustratos complejos, donde se encuentran presentes proteínas, lípidos, hidratos de carbono, agua y otros componentes minoritarios, por lo que suele ser necesaria una purificación de los extractos para eliminar posibles interferencias.

Para la extracción de las toxinas de *Alternaria* spp. de alimentos se han utilizado métodos de extracción líquido/líquido (ELL) y técnicas de extracción en fase sólida (EFS), principalmente basadas en columnas de octadecilsilíce (C18), aminopropilo y de equilibrio hidrófilo-lipofílico (HLB). La ELL se ha aplicado para la extracción de micotoxinas de *Alternaria* spp. en tomate y derivados (Scott y Kanhere, 1980; Stack y col., 1985; da Motta y Soares, 2000a, b; Andersen y Frisvad, 2004), zumos de fruta y bebidas (Lau y col., 2003), semillas oleaginosas (Nawaz y col., 1997), cereales y derivados (Yu y col., 1999; Herebian y col., 2009; Siegel y col., 2009; Sulyok y col., 2007, 2010; Rasmussen y col., 2010) y cerveza (Siegel y col., 2010). Los disolventes orgánicos más empleados en la ELL son el metanol, acetato de etilo, cloroformo y mezclas de ellos.

La EFS se ha utilizado para la purificación a partir de muestras de tomate y derivados (Fente y col., 1998), cítricos (Magnani y col., 2007), zumos de frutas y bebidas

(Delgado y col., 1996; Scott y col., 1997; Lau y col., 2003; Asam y col., 2009). Por último, también se ha propuesto la combinación de métodos de ELL y EFS para la extracción de toxinas a partir de muestras de zanahoria (Solfrizzo y col., 2004), suplementos alimenticios (di Mavungu y col., 2009), pimientos (Monbaliu y col., 2009), cereales, frutas y hortalizas (Asam y col., 2010) y soja irradiada (Oviedo y col., 2011).

### II.5.3. Métodos de detección

#### II.5.3.1. Técnicas inmunológicas

Las técnicas inmunológicas son procedimientos analíticos basados en la reacción específica entre un antígeno y su correspondiente anticuerpo. Con frecuencia se utilizan técnicas inmunológicas de cribado para la detección rápida de micotoxinas, con el fin de descartar las muestras negativas y reducir al máximo el número de análisis, aunque puede ser necesario emplear posteriormente alguna técnica de confirmación para validar los resultados positivos. Las técnicas inmunoenzimáticas de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) constituyen en la actualidad los métodos inmunológicos más utilizados en el análisis de micotoxinas en alimentos. Se caracterizan por el empleo de marcadores enzimáticos para la detección y amplificación de las reacciones antígeno-anticuerpo. En estas técnicas, uno de los elementos de la reacción (antígeno o anticuerpo) se fija a un soporte sólido, generalmente placas de poliestireno, polivinilo o nylon, que permite su adsorción pasiva y la eliminación de los compuestos libres mediante lavado. Una vez inmovilizados los antígenos o los anticuerpos, la interacción

antígeno-anticuerpo se detecta mediante la reacción colorimétrica producida por la acción de una enzima (conjugada al antígeno o al anticuerpo) al degradar el sustrato correspondiente. La medida de la absorbancia en los pocillos de la placa de ELISA permite cuantificar la reacción inmunológica. Existen diversos formatos de las técnicas inmunoenzimáticas, que se clasifican atendiendo al componente de la reacción que se fija en primer lugar, la fase sólida utilizada y si se emplean o no concentraciones limitantes de antígeno y anticuerpo. Yu y col. (1999) utilizaron el formato de ELISA competitivo directo para la detección de AAL TA toxinas en piensos, obteniendo un límite de cuantificación de 50 µg/kg. Burkin y Kononenko (2011) emplearon anticuerpos policlonales para la detección de AOH en maíz contaminado y piensos, alcanzando límites de cuantificación de 20 µg/kg. Del mismo modo, se han utilizado anticuerpos monoclonales y policlonales para la detección de AOH en manzana, tomate y derivados con límites de detección de 1 y 2 µg/kg, respectivamente (Ackermann y col., 2011). Sin embargo, no se han desarrollado técnicas inmunológicas para la detección de AME, ALT, ATX-I y TeA en alimentos (Ostry, 2008).

#### II.5.3.2. Técnicas cromatográficas

##### Cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina es una técnica muy utilizada para detectar la presencia de micotoxinas en alimentos. En la técnica de TLC la fase estacionaria es polar y consiste en una capa delgada de un adsorbente, habitualmente de gel de sílice, alúmina o celulosa, depositada sobre una



placa de vidrio, papel de aluminio u otros materiales. Las muestras se aplican sobre la fase estacionaria, y son arrastradas por la fase móvil (apolar). Los componentes de las muestras se separarán según su solubilidad y grado de adsorción. Existen numerosas variantes de la técnica en función del disolvente utilizado como fase móvil y de si se realiza en una o dos dimensiones. La presencia de AOH, AME y ALT se determina con luz UV de onda larga (366 nm) o corta (254 nm). Sin embargo, el TeA no emite fluorescencia cuando se le aplica luz UV, por lo que es necesario pulverizar la placa con un reactivo revelador con el fin de formar un derivado coloreado. Utilizando técnicas de TLC se ha analizado la presencia de AOH, AME, ALT y TeA en muestras de semillas de linaza y granos de trigo, obteniéndose límites de cuantificación de 5 µg/kg para AOH, AME y ALT, y de 25 µg/kg para TeA (Matysik y Giryń, 1996; Skarkova y col., 2005).

#### Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Las técnicas de HPLC ofrecen mayor precisión y sensibilidad que las técnicas de TLC. La cromatografía líquida de alta resolución, utilizando columnas de fase inversa (RP-HPLC), es la técnica más utilizada en la detección y cuantificación de las micotoxinas de *Alternaria* spp. en alimentos. Esta técnica permite separar las micotoxinas atendiendo a su polaridad, es decir, a su distribución entre una fase móvil polar y una fase orgánica que está unida a una matriz. De este modo se obtienen perfiles cromatográficos característicos de cada micotoxina, que permiten su identificación mediante comparación

con cromatogramas de referencia. Las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía son las compuestas por partículas de sílice unidas a hidrocarburos, como son las columnas de octadecilsílice (C18), y las columnas de pentafluorofenilo (PFP) (Andersen y col., 2006; Magnani y col., 2007; Patriarca y col., 2007; Ostry, 2008; Pose y col., 2010). La fase móvil consiste en mezclas de disolventes polares (acetonitrilo, metanol, hexano y agua) que arrastran los distintos componentes de la muestra a través de la fase estacionaria. La detección de las micotoxinas se puede realizar por medio de detectores de fluorescencia (FLD) (Stack y col., 1985; Nawaz y col., 1997; Fente y col., 1998; Andersen y Frisvad, 2004), de ultravioleta (UV) (Scott y Kanhere, 1980; Stack y col., 1985; Nawaz y col., 1997; Oviedo y col., 2011) y de array de diodos (DAD) (Delgado y col., 1996; da Motta y Soares, 2000a, b; Andersen y Frisvad, 2004; Solfrizzo y col., 2004). Los límites de detección de estas técnicas son muy variados, y van desde 0,7 µg/kg para AME en zumo de manzana (Delgado y col., 1996) a 350 µg/kg para TeA en semillas de girasol (Nawaz y col., 1997).

En los últimos años se han conseguido mejorar la precisión y sensibilidad de las técnicas de cromatografía líquida mediante el acoplamiento de detectores de masas. La espectrometría de masas (MS) se basa en la posibilidad de separar especies moleculares y atómicas según su relación masa-carga. Para ello es necesario ionizar las moléculas y obtener los iones formados en fase gaseosa. Este proceso tiene lugar en una fuente de ionización y, actualmente, existen diferentes técnicas que permiten

llevarlo a cabo como el Impacto Electrónico (EI), Bombardeo con Átomos Rápidos (FAB), Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI), Desorción/Ionización por Láser Asistida por Matriz (MALDI) o Electrospray (ESI). Los iones generados son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación masa-carga mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos o simplemente determinando el tiempo de llegada a un detector. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. El patrón de fragmentación resultante, así como los iones residuales, constituyen el espectro de masas. En principio, el espectro de masas de cada compuesto es único y se puede utilizar para caracterizar el analito. Las técnicas de cromatografía líquida acopladas a espectrometría de masas se han utilizado en numerosas ocasiones para la detección de micotoxinas de *Alternaria* spp. en piensos y alimentos (Tabla 7). Por último, otra técnica cromatográfica que se ha empleado, aunque con menor frecuencia, para la detección de micotoxinas de *Alternaria* spp., es la cromatografía de gases (Scott y col., 1997).

## II.6. DETECCIÓN DE *ALTERNARIA* SPP. EN ALIMENTOS MEDIANTE TÉCNICAS FENOTÍPICAS

La detección de cada una de las toxinas producidas por las diferentes especies de *Alternaria* en alimentos no resultaría práctica ni realista, puesto que el elevado coste económico resultaría inviable (Bullerman y Gourama, 2001). Por este motivo, desde el punto de vista preventivo adquiere

una mayor relevancia poder detectar el moho productor de micotoxinas. Esto permitiría a las industrias elaboradoras establecer un control adecuado de sus proveedores, mejorar la trazabilidad de sus productos y eliminar de los canales de comercialización los lotes que puedan representar un peligro para la salud del consumidor.

### II.6.1. Métodos de cultivo y aislamiento en placa

La enumeración e identificación de mohos en los alimentos se realiza habitualmente mediante la siembra de la muestra en placas de agar con medios de cultivo selectivos, seguida del aislamiento y análisis pormenorizado de sus características morfológicas y fisiológicas conforme a claves de identificación específicas (Ellis y Ellis, 1997; Samson y col., 2004). El análisis se realiza mediante la siembra directa de las muestras o diluciones de las mismas. Para muestras como granos de cereal o frutos secos, que se siembran directamente, la desinfección de la superficie es esencial en muchos casos, para poder realizar un recuento y aislamiento de las especies fúngicas presentes en los mismos (Samson y col., 2004). Los medios de cultivo utilizados para analizar la presencia de *Alternaria* spp. en alimentos son muy variados. Se han utilizado medios de cultivo generales como agar patata dextrosa (PDA) y agar extracto de malta (MEA) o medios de cultivo más específicos como agar patata zanahoria (PCA), PCA con cicloheximida (PCA-c), PCA con manganeso (PCA-Mn, Sorensen y col., 2009) y agar sacarosa-extracto de levadura-rosa de bengala-

**Tabla 7.** Determinación de micotoxinas de *Alternaria* spp. en alimentos y piensos mediante técnicas de cromatografía líquida acoplada a detectores de espectrometría de masas.

Producto	Micotoxinas analizadas	Técnica	Referencia
Cereales	TeA	HPLC-MS/MS <sup>a</sup>	Siegel y col. (2009)
Cereales, zumos vegetales, derivados de tomate y vino	AOH, AME	HPLC-MS/MS	Asam y col. (2009, 2010)
Mandarinas	AOH, AME	HPLC-MS/MS	Magnani y col. (2007)
Suplementos alimenticios	AOH, AME, ALT	HPLC-MS/MS	di Mavungu y col. (2009)
Cerveza	TeA	LC-MS/MS <sup>b</sup>	Siegel y col. (2010)
Zumos de fruta y vino	AOH, AME	LC-MS/MS	Scott y col. (2006)
Zumos de fruta	AOH, AME	LC-MS/MS	Lau y col. (2003)
Pimiento	AOH, AME, ALT	LC-MS/MS	Monbaliu y col. (2009)
Tomate y derivados	AOH, AME, ALT, TeA, TEN, ATX-I	UPLC-MS/MS <sup>c</sup>	Noser y col. (2011)
Pienso, granos de trigo y maíz	AOH, AME	LC-MS/MS	Monbaliu y col. (2010)
Maíz ensilado	AOH, AME	LC-MS/MS	Rasmussen y col. (2010)
Maíz ensilado	AAL-TA, AAL-TB	HPLC-MS <sup>d</sup>	Mansfield y col. (2007)

<sup>a</sup> HPLC-MS/MS: Cromatografía líquida de alta resolución con doble detector de espectrometría de masas

<sup>b</sup> LC-MS/MS: Cromatografía líquida con doble detector de espectrometría de masas

<sup>c</sup> UPLC-MS/MS: Cromatografía líquida de ultra resolución con doble detector de espectrometría de masas

<sup>d</sup> HPLC-MS: Cromatografía líquida de alta resolución con detector de espectrometría de masas

diclorán (DRYES, Frisvad, 1983). La identificación de las especies de *Alternaria* se realiza atendiendo a las características morfológicas y fisiológicas que presentan cuando crecen en DRYES y PCA (Andersen y col., 2001, 2002, 2008, 2009; Simmons, 2007). La realización de estas técnicas presenta los inconvenientes de ser laboriosas, exigir mucho tiempo para la obtención de resultados y requerir gran experiencia en la identificación de mohos (Andersen y Frisvad, 2004). Un inconveniente adicional consiste en que las técnicas basadas en el empleo de medios de cultivo solo permiten detectar los mohos viables y no los que se han inactivado como consecuencia del tratamiento tecnológico empleado en la elaboración de los alimentos analizados. Considerando que las micotoxinas, a diferencia de los mohos productores, son termorresistentes, la imposibilidad de detectar mohos inactivados con los métodos de detección convencionales puede proporcionar conclusiones erróneas sobre la calidad de la materia prima y la seguridad del producto analizado (Gourama y Bullerman, 1995). En este sentido, se han desarrollado técnicas alternativas, más rápidas y eficaces para la detección e identificación de *Alternaria* spp. en alimentos. Entre estas técnicas destacan las técnicas genéticas, el análisis cromatográfico de metabolitos celulares y las técnicas inmunológicas.

### II.6.2. Detección de metabolitos y constituyentes celulares

Algunos metabolitos y constituyentes celulares, como el ergosterol, la quitina o las lectinas se han utilizado para el desarrollo de

métodos rápidos de detección de mohos tóxicos (Gourama y Bullerman, 1995; Beuchat y Cousin, 2002; Marín y col., 2005; Konkol y col., 2010; As'wad y col., 2011). El ergosterol es un componente de las membranas celulares de los mohos, que no está presente en las células vegetales y animales. Las propiedades del ergosterol hacen que sea un marcador adecuado para la detección tanto de formas viables como no viables de mohos en piensos y alimentos. El ergosterol se ha utilizado como indicador de contaminación fúngica en granos de cereales (Magan, 1993; Regner y col., 1994; Tothill y col., 1995) y en una gran variedad de frutas y hortalizas frescas y procesadas (Bertoni y col., 1994; Ghiretti y col., 1995; Gutarowska y Zakowska, 2010).

La concentración de ergosterol presente en una muestra se determina mediante técnicas espectrofotométricas, ya que el ergosterol presenta un elevado poder de absorción de luz UV entre 240 y 300 nm, mientras que los esteroides de las plantas absorben débilmente a longitudes de onda superiores a 240 nm (Seitz y col., 1977). Aunque el ergosterol sea específico de los mohos y se utilice como indicador de biomasa fúngica, en muchas ocasiones no existe una correlación adecuada entre su concentración y la biomasa fúngica presente en una muestra (Gessner y Chauvet, 1993). Este hecho se explica porque el contenido de ergosterol depende de variables como la especie fúngica, la etapa de desarrollo y las condiciones de crecimiento (Gourama y Bullerman, 1995; Beuchat y

Cousin, 2002; Gutarowska y Zakowska, 2009).

La quitina y la lectina son otros compuestos utilizados para determinar la presencia de mohos en alimentos. El análisis de compuestos derivados de su metabolismo, como la N-acetil glucosamina, se ha utilizado como indicador del grado de contaminación fúngica. Sin embargo, los métodos de extracción y detección de estos compuestos son lentos y laboriosos, por lo que su utilidad en la detección de mohos toxigénicos es limitada (Gourama y Bullerman, 1995; Potts y col., 2000; Beuchat y Cousin, 2002). En todo caso la detección de metabolitos y componentes celulares permite detectar mohos en alimentos, pero no es útil en la diferenciación de géneros y especies toxigénicas.

#### II.6.3. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales correspondientes a diferentes parámetros de la célula que son recogidos por distintos detectores. Estos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula. La citometría de flujo se ha utilizado para detectar la viabilidad de cultivos de levaduras y mohos sometidos a determinados tratamientos térmicos (Bleve y col., 2003;

Mayoral y col., 2006). Sin embargo, su aplicación en alimentos se ha visto limitada por la gran cantidad de partículas que estos contienen. Por otra parte, la aplicación de la citometría de flujo en la detección de mohos filamentosos como *Alternaria* spp., está limitada por el hecho de que no presentan una distribución morfológica homogénea, lo que complica el análisis de los resultados (Beuchat y Cousin, 2002).

#### II.6.4. Métodos inmunológicos

La detección de componentes proteicos mediante métodos inmunológicos se ha utilizado para la detección específica de diversos géneros y especies fúngicas. La detección de *Alternaria* spp. por medio de técnicas inmunológicas se basa, habitualmente, en el desarrollo de anticuerpos frente al péptido Alt a 1, que es el principal alérgeno de *A. alternata* y de otras especies de este género (Abebe y col., 2006). Entre los métodos inmunológicos más utilizados para la detección de *Alternaria* spp., destaca la técnica de ELISA tipo sándwich. Sin embargo, las técnicas inmunológicas se emplean principalmente para analizar el grado de sensibilización de la población, ya que *Alternaria* es uno de los géneros fúngicos más implicados en la producción de alergias (Asturias y col., 2003, 2005; Martínez y col., 2006). La utilización de estas técnicas para la detección de *Alternaria* spp. en alimentos es limitada debido a la existencia de reacciones cruzadas con componentes de los alimentos o metabolitos fúngicos presentes en estos (Schmechel y col., 2008).

### II.6.5. Métodos cromatográficos

El estudio del perfil de metabolitos secundarios producidos por *Alternaria* spp. también se ha utilizado para la identificación de especies pertenecientes a este género. Entre los métodos utilizados con este fin, destacan la cromatografía en capa fina (TLC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de masas o de array de diodos (Samson y col., 2004). La utilización de estos métodos analíticos genera un perfil metabólico específico para cada especie e incluso para cada cepa, por lo que son de gran utilidad para la correcta identificación y clasificación de las diferentes especies de *Alternaria*. La clasificación de las especies de *Alternaria* según su perfil metabólico se realiza habitualmente mediante la elaboración de dendrogramas basados en la producción o no producción de determinados metabolitos secundarios (Andersen y col., 2001, 2002, 2008, 2009; Simmons, 2007). De este modo, la utilización conjunta del análisis morfológico y de los metabolitos producidos, permite realizar una clasificación adecuada de las diferentes especies de *Alternaria* aisladas de alimentos.

El análisis de los metabolitos producidos por *Alternaria* spp. resulta eficaz cuando la extracción de estos se realiza a partir de medios de cultivo, donde las condiciones de crecimiento del moho están controladas. Sin embargo, la identificación y clasificación de las especies de *Alternaria* en alimentos es más compleja ya que las condiciones ambientales son muy variables, y modifican la producción de los metabolitos secundarios.

### II.7. DETECCIÓN DE *ALTERNARIA* SPP. EN ALIMENTOS MEDIANTE TÉCNICAS GENÉTICAS

La detección y caracterización de *Alternaria* spp. basada en sus características fenotípicas presenta el inconveniente de que su expresión depende de las condiciones de crecimiento como la temperatura, el pH, la actividad de agua o la disponibilidad de nutrientes, entre otros factores.

Las técnicas genéticas se basan en el reconocimiento específico de fragmentos de ácidos nucleicos presentes en los seres vivos. La principal ventaja de las técnicas genéticas sobre los métodos de identificación fenotípica es que no se ven afectadas por las condiciones ambientales y no dependen de la interpretación, a veces subjetiva, de las características morfológicas (Niessen, 2007).

Entre las técnicas genéticas, las basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son, sin duda, las más utilizadas para el análisis de mohos toxigénicos en los alimentos y constituyen una alternativa importante a las técnicas de cultivo tradicionales (Zur y col., 2002; Niessen, 2007). Los métodos basados en PCR empleados con mayor frecuencia para la identificación de *Alternaria* spp. en alimentos incluyen la secuenciación (PCR-secuenciación), el análisis del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD), el análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP), el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) y la amplificación de fragmentos de genes

mediante el empleo de cebadores específicos.

A continuación se detallan las principales técnicas genéticas aplicadas a la detección de *Alternaria* spp. en alimentos.

#### **II.7.1. Secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados por PCR (PCR-secuenciación)**

Este método de identificación consiste en la amplificación de un determinado fragmento de un gen por PCR y su posterior secuenciación. Mediante el análisis de las secuencias obtenidas se pueden identificar diferencias interespecíficas que permiten diferenciar las especies de *Alternaria* estudiadas.

Actualmente, los métodos de secuenciación más utilizados son la secuenciación manual por el método enzimático de terminación de cadena de Sanger y la secuenciación automática. El método de Sanger se basa en la utilización de isótopos radioactivos y autorradiografías de gel para la secuenciación del ADN, mientras que la secuenciación automática se realiza mediante el empleo de compuestos fluorescentes. La secuenciación por fluorescencia permite automatizar el proceso y aumentar el número de nucleótidos que se pueden determinar en cada reacción. Recientemente han surgido diversas técnicas alternativas de secuenciación de ADN como la pirosecuenciación, la secuenciación por nanoporos o la secuenciación por hibridación (SBH) (Shendure y col., 2008; Voelkerding y col., 2009). No obstante, a pesar de los últimos avances producidos en los equipos y metodologías, la secuenciación de fragmen-

tos de ADN amplificados por PCR sigue siendo una herramienta analítica relativamente costosa como técnica de análisis rutinaria.

La técnica de PCR-secuenciación es muy útil en la elaboración de estudios filogenéticos con el fin de realizar una clasificación correcta de las especies de *Alternaria*. Pryor y Gilbertson (2000) utilizaron el espaciador interno de la transcripción (ITS) y el gen que codifica la subunidad mitocondrial pequeña (mt SSU) del ADN ribosómico (ADNr) para la secuenciación del ADN de 18 especies de *Alternaria*, clasificando las especies en cuatro grupos diferenciados: *A. alternata*, *A. brassicicola*, *A. porri* y *A. radicina*. La clasificación de las especies de *Alternaria* en estos cuatro grupos principales coincidía con la obtenida a partir del estudio de las características morfológicas.

Bensassi y col. (2009) utilizaron cebadores diseñados en el ITS para la detección de *Alternaria* spp. en granos de trigo alterados. Los fragmentos de ADN obtenidos a partir de los granos de trigo contaminados se secuenciaron. El análisis de estos fragmentos permitió identificar la presencia de *A. alternata*, *A. tenuissima* y *A. japonica* en las muestras contaminadas.

Los genes que codifican la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gpd) y el Alt a 1, también se han utilizado en la realización de estudios filogenéticos de las especies de *Alternaria* (Cramer y Lawrence, 2003; Hong y col., 2005). En estos estudios las especies de *Alternaria* se clasificaron en cinco grupos principales: *A. alternata*, *A. infectoria*, *A. radicina*, *A. porri* y *A. brassicicola*.

### II.7.2. Análisis del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD)

La técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) se basa en la amplificación simultánea de múltiples fragmentos de ADN mediante PCR, utilizando para ello cebadores de cadena corta cuya secuencia se escoge al azar. Estos cebadores hibridan de manera inespecífica y aleatoria en diferentes lugares del genoma, lo que permite la amplificación de fragmentos polimórficos de ADN. El número y tamaño de los fragmentos amplificados a partir de un determinado ADN se mantiene constante siempre que se utilice el mismo cebador y se haga el análisis en las mismas condiciones. De este modo, los perfiles obtenidos mediante RAPD son muy útiles para determinar relaciones taxonómicas intraespecíficas y para estudios epidemiológicos.

La principal ventaja de esta técnica es que no es necesario conocer previamente las secuencias de ADN que se pretenden amplificar. Asimismo, permite examinar un gran número de polimorfismos en el ADN lo cual resulta de gran utilidad para llevar a cabo la identificación de especies íntimamente relacionadas y especies que presentan un bajo nivel de variabilidad genética. El mayor inconveniente de la técnica de RAPD reside en la dificultad de obtener resultados reproducibles, por lo que la amplificación ha de desarrollarse bajo condiciones estrictamente controladas y estandarizadas. Además, la técnica de RAPD no permite identificar el ADN de un determinado organismo en mez-

clas complejas de ADN, lo que limita su aplicación para la detección de *Alternaria* spp. en alimentos (Edel y col., 1997).

Roberts y col. (2000) analizaron la variabilidad molecular de especies del grupo de *A. alternata*, pudiendo diferenciar molecularmente *A. alternata*, *A. gaisen*, *A. longipes* y *A. tenuissima*. Por otra parte, Pryor y Gilbertson (2002) observaron una variabilidad genética mínima entre *A. radicina*, *A. carotiincultae* y *A. petroselini*.

La técnica de RAPD también se ha utilizado en estudios epidemiológicos y de variabilidad genética de las especies de *Alternaria* causantes de enfermedades en vegetales. En cuanto a los estudios epidemiológicos, esta técnica se ha utilizado para identificar a *A. alternata* y *A. tenuissima* como las especies causantes de determinadas enfermedades en las parras (Polizzotto y col., 2012). Lourenço y col. (2011) encontraron una variabilidad genética significativa entre las cepas de *A. solani* causantes del tizón temprano en tomate y patata, pudiendo diferenciar las cepas aisladas del tomate y de la patata. En otros estudios, utilizando la técnica de RAPD, se llevó a cabo la identificación de especies de *Alternaria* causantes de enfermedades en crucíferas, manzana, zanahoria y pistacho (Serdani y col., 1997; Sharma y Tewari, 1998; Pryor y Gilbertson, 2001; Pryor y Michaliades, 2002; Rogers y Stevenson, 2007; Park y col., 2008).

La variabilidad genética presente entre las especies de *Alternaria* patógenas de plantas, también se ha estudiado mediante técnicas de RAPD. Diversos estudios, han



demostrado la presencia de diferentes cepas de *A. alternata* causantes de enfermedades en cítricos (Peever y col., 2002; Dini-Andreote y col., 2009; Kakvan y col., 2009). Santha y col. (2009) aislaron también diferentes cepas de *A. helianthi* de girasoles alterados.

### II.7.3. Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP)

La técnica de PCR-RFLP se basa en la amplificación de fragmentos de ADN específicos mediante PCR y su posterior tratamiento con enzimas de restricción, que los cortan en fragmentos más pequeños. Las diferencias existentes en la secuencia nucleotídica entre las distintas especies estudiadas, darán lugar a fragmentos de diferentes tamaños que se examinan mediante electroforesis. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la identificación de diferentes especies y cepas fúngicas. Su utilidad en la diferenciación de mohos toxigénicos está limitada al conocimiento previo de los perfiles de fragmentos de restricción de especies o cepas toxigénicas con las que se puedan comparar los perfiles obtenidos.

Diguta y col. (2011) desarrollaron una técnica de PCR-RFLP para la detección de diferentes especies fúngicas en uvas. La detección de *A. alternata* se llevó a cabo mediante la amplificación de un fragmento de 570 pb en el ITS, seguida de la restricción con las endonucleasas *HaeIII* y *SduI*.

La variabilidad intraespecífica de las cepas de *A. alternata* responsables del tizón

temprano en pistacho se ha estudiado utilizando una técnica de PCR-RFLP. Así, Pryor y Michailides (2002) sometieron un fragmento de 2700 pb del espaciador intergénico (IGS) a la digestión con las enzimas de restricción *RsaI*, *MboI*, *HinfI*, *HaeIII* y *AluI*, permitiendo la diferenciación de diferentes cepas de *A. alternata*. Asimismo, Aradhya y col. (2001) diferenciaron varias cepas de *A. alternata* mediante la digestión enzimática con *HindIII*, *EcoRI* y *XbaI* de un fragmento de ADN amplificado en el gen *Alt a 1*.

### II.7.4. Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)

La técnica de AFLP se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de ADN previamente obtenidos mediante digestión con enzimas de restricción. Es específica y reproducible al usar cebadores complementarios que se ligan a los extremos de los fragmentos de ADN digeridos. Las diferencias existentes en la secuencia nucleotídica darán lugar a un patrón de bandas específico para cada cepa analizada. La técnica de AFLP es una herramienta útil para la identificación de especies y subespecies de mohos filamentosos (Chulze y col., 2000; Perrone y col., 2006). Las ventajas de esta técnica son los elevados niveles de polimorfismo que puede detectar, su mayor reproducibilidad en comparación con la técnica de RAPD, y el hecho de que se puede automatizar (Aarts y Keijer, 1999).

Somma y col. (2011) desarrollaron una técnica de AFLP para identificar y clasificar cepas de *Alternaria* aisladas de tomates

frescos y pasta de tomate. Las cepas de *Alternaria* aisladas se clasificaron en cuatro grupos de especies: *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens* y *A. infectoria*. Sin embargo, en este estudio no se encontraron diferencias significativas entre las especies incluidas en los grupos de *A. alternata* y *A. tenuissima*. De forma similar, Hong y col. (2006) clasificaron también las cepas de *Alternaria* aisladas de nueces y avellanas en cuatro grupos, no obteniendo diferencias entre los grupos de *A. alternata* y *A. tenuissima*. Gannibal y col. (2007) detectaron una baja variabilidad nucleotídica entre las cepas de *A. tenuissima* aisladas de granos de trigo. Por último, cabe destacar que en todos los estudios descritos anteriormente se utilizaron las enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI*.

#### II.7.5. PCR con cebadores específicos

Una de las estrategias más comúnmente utilizadas en las técnicas de PCR aplicadas a la identificación de especies, consiste en el diseño de cebadores específicos para la amplificación selectiva de fragmentos de ADN a partir de diferentes organismos.

Para el diseño de cebadores específicos es necesario disponer de marcadores genéticos con un grado de variabilidad inter-específica adecuado. El ADN ribosómico constituye una diana apropiada para la localización de secuencias específicas de especie, debido a su abundancia y a que posee regiones con diferentes grados de variabilidad intra e interespecífica, suficientes para diferenciar géneros, especies o cepas de una misma especie. Concretamente, los espaciadores internos de la transcripción, ITS1 e

ITS2, se han empleado con frecuencia para la detección e identificación de especies de *Alternaria* en alimentos. Así, Zur y col. (1999) diseñaron cebadores en el ITS para la detección específica de *Alternaria* spp. en tomate y derivados. Posteriormente, estos investigadores desarrollaron una técnica de PCR para la detección específica de *A. alternata* y *A. solani* en granos de cereales (Zur y col., 2002).

Konstantinova y col. (2002) desarrollaron una técnica de PCR utilizando cebadores especie-específicos diseñados en el ITS, para la detección de *A. alternata*, *A. radicina* y *A. dauci* en zanahorias, ya que son las especies aisladas principalmente en este tipo de alimentos. Estos investigadores también desarrollaron una técnica de RAPD-PCR, con la que obtuvieron los mismos resultados.

En comparación con otras técnicas genéticas alternativas como el método de PCR-secuenciación o los ensayos de PCR-RFLP, la técnica de PCR con cebadores específicos ofrece las ventajas de ser más rápida y útil para el análisis de un elevado número de muestras. Su principal inconveniente radica en la necesidad de conocer previamente las secuencias de las especies que se pretenden diferenciar, a fin de poder diseñar oligonucleótidos específicos para cada una de ellas.

#### II.7.6. PCR en tiempo real

En la actualidad, los ensayos de PCR que se desarrollan en varios pasos, desde la amplificación del material genético al análisis de los productos resultantes, están evolucionando hacia procedimientos más rápidos y

automatizados en un solo tubo. Estos avances en las técnicas de PCR se basan en la utilización de equipos con un sistema de detección espectrofluorimétrica, que permiten identificar en tiempo real el producto de amplificación generado.

En los últimos años, se han descrito varios tipos de ensayos de PCR en tiempo real, que se pueden dividir en dos grandes grupos: sistemas no específicos y específicos. Los sistemas no específicos detectan la presencia o ausencia de amplicones, pero no proporcionan información sobre la identidad de los productos generados. En este tipo de ensayos se incluyen, por ejemplo, los que utilizan agentes intercaladores fluorescentes de la doble cadena de ADN como el bromuro de etidio y el SYBR® Green. En los sistemas específicos se emplean diversos tipos de sondas fluorescentes (TaqMan®, FRET, *Molecular Beacons* y *Scorpions*), que hibridan específicamente en la secuencia del ADN diana. Dentro de los sistemas específicos, las sondas de hibridación tipo TaqMan® son las más utilizadas (Fredlund y col., 2010; Passone y col., 2010; Kulik y col., 2011; Rodríguez y col., 2012).

A pesar del elevado número de trabajos publicados que emplean la técnica de PCR en tiempo real para la detección de especies fúngicas en alimentos (Mulé y col., 2006; Gil-Serna y col., 2009; González-Salgado y col., 2009; Fredlund y col., 2010; Castellá y Cabañes, 2011; Rodríguez y col., 2011, 2012; Atoui y col., 2012) la aplicación de esta técnica para la detección de *Alternaria* spp. ha sido muy escasa. Hasta el mo-

mento, los únicos trabajos publicados son los desarrollados por Guillemette y col. (2004) y Andersen y col. (2006).

Guillemette y col. (2004) desarrollaron una técnica de PCR en tiempo real con SYBR® Green para detectar y cuantificar ADN de *A. brassicae* en muestras de crucíferas. Para ello emplearon parejas de cebadores especie-específicos diseñados en el gen que codifica la péptido sintetasa no ribosomal (NRPS) y la proteína ABC (ATP-binding cassette). Además, estos investigadores emplearon como control endógeno una pareja de cebadores diseñados en el ITS para la detección de especies fúngicas.

Andersen y col. (2006) utilizaron también SYBR® Green para la detección de *Alternaria* spp. en muestras de manzana. Los cebadores diseñados en el gen de la AM-toxina permitieron la amplificación y cuantificación del ADN de las cepas de *Alternaria* aisladas de las muestras de manzana. Además, en este trabajo se determinó el modelo de esporulación de las cepas de *Alternaria* aisladas y se analizaron los metabolitos secundarios producidos. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, las cepas de *Alternaria* aisladas por Andersen y col. se clasificaron dentro del grupo de *A. tenuissima*.

La técnica de PCR en tiempo real presenta numerosas ventajas para el análisis rutinario de contaminación fúngica en alimentos. Por ejemplo, el tiempo necesario para obtener los resultados se reduce, al no requerir el análisis electroforético posterior de los productos de PCR. Además, al realizarse todo el proceso en el mismo tubo, se minimi-

zan las posibilidades de contaminación con ADN exógeno y se facilita la automatización. Por otra parte, esta técnica no solo proporciona resultados cualitativos (presencia o ausencia de la secuencia diana), sino que también cuantifica, permitiendo calcular la cantidad inicial de ADN fúngico y, por tanto, estimar el nivel de contaminación de mohos productores de micotoxinas de una muestra analizada. Además, esta técnica de PCR es más sensible y rápida que la de PCR convencional. No obstante, el mayor inconveniente de estos sistemas es su elevado coste en comparación con otros métodos de PCR como la técnica de PCR convencional con cebadores específicos.

#### **II.7.7. PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR)**

Disponer de técnicas rápidas para la detección precoz de mohos viables presentes en las materias primas permitiría a las industrias alimentarias rechazar lotes de materias primas que no cumplan los parámetros de calidad y seguridad definidos, así como establecer medidas correctoras que eviten la formación de micotoxinas en fases posteriores y su presencia en los productos finales. Teniendo en cuenta que el ARN se degrada poco tiempo después de la muerte celular, la técnica que hoy en día ofrece un mayor potencial para la detección y/o discriminación de las células viables y no viables es la de RT-PCR, que emplea la transcriptasa inversa en la primera etapa de la amplificación (Herman, 1997). La técnica de RT-PCR se basa en la transcripción del ARN a ADNc por medio de la transcriptasa inversa y posterior amplifica-

ción específica de los fragmentos de ADNc obtenidos (Sheridan y col., 1998; Hierro y col., 2006).

La técnica de RT-PCR se ha utilizado para relacionar la detección de ARN fúngico con la producción de micotoxinas. Diversos investigadores han relacionado la detección de ARN de mohos toxigénicos como *Fusarium* y *Aspergillus* con la presencia de fumonisinas y aflatoxinas en diversos alimentos (Scherer y col., 2005; López-Errasquín y col., 2007; Degola y col., 2009; de Oliveira y col., 2011; Vegi y col., 2011). Además, esta técnica se ha utilizado para estudiar la influencia de las condiciones de crecimiento fúngico en la expresión de los genes implicados en la producción de micotoxinas (Kale y col., 2007; Jurado y col., 2008; Taylor y col., 2008; Marín y col., 2010).

#### **II.7.8. Microarrays de ADN**

Los microarrays de ADN son dispositivos consistentes en un gran número de fragmentos de ADN de una sola hebra (sondas), ordenados en dos dimensiones y unidos a la superficie de un pequeño soporte sólido. Los ácidos nucleicos de las muestras a analizar se marcan y se incuban sobre la matriz con las sondas, produciéndose la hibridación de las secuencias homólogas. Así, el material genético marcado, se une a su complementario inmovilizado en el soporte del chip, permitiendo la identificación del ADN presente en la muestra. Finalmente, el escáner y las herramientas informáticas permiten interpretar y analizar los datos obtenidos. La principal ventaja de esta tecnología reside en la posibi-

lidad de analizar simultáneamente miles de genes.

Los microarrays se han utilizado para estudiar la expresión de genes relacionados con la síntesis de micotoxinas. Kristensen y col. (2007) utilizaron los microarrays de ADN para detectar catorce especies patógenas de *Fusarium* productoras de tricotecenos y moniliformina. Schmidt-Heydt y Geisen (2007) desarrollaron un sistema de microarrays para detectar e identificar la ruta de biosíntesis de fumonisinas, aflatoxinas, ocratoxina A, patulina y tricotecenos. Lezar y Barros (2010) identificaron 32 especies de mohos toxigénicos

aislados de alimentos mediante el desarrollo de una serie de microarrays. La fiabilidad de estos ensayos puede incrementarse al incluir fragmentos genéticos específicos de especies y secuencias con información filogenética de las especies potencialmente productoras, conjuntamente con genes esenciales involucrados en la biosíntesis de micotoxinas. La técnica de microarrays es más rápida y versátil que las técnicas de PCR convencional y PCR en tiempo real. Sin embargo, esta técnica requiere una gran inversión inicial en el desarrollo del sistema y la puesta a punto de cada biochip y necesita disponer de personal entrenado en su uso.

*CAPÍTULO III*  
*Results and Discussion*  
*(Published articles)*

---



### III.1. DETECTION AND IDENTIFICATION OF *ALTERNARIA* SPP. IN FOODSTUFFS BY PCR TECHNIQUES

#### III.1.1. PCR USING GENUS-SPECIFIC AND GROUP-SPECIFIC PRIMERS

- PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker *Alt a 1*



***Food Control***

Volume 21, pages 1745-1756, 2010

#### III.1.2. PCR USING GENUS-SPECIFIC PRIMERS

- PCR detection of *Alternaria* spp. in processed foods, based on the Internal Transcribed Spacer genetic marker



***Journal of Food Protection***

Volume 74, pages 240-247, 2011







Contents lists available at ScienceDirect

## Food Control

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)

## PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker *Alt a 1*

Miguel Ángel Pavón, Isabel González, Nicolette Pegels, Rosario Martín, Teresa García\*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 31 May 2010

Received in revised form

30 July 2010

Accepted 23 August 2010

## Keywords:

*Alternaria* species-groups*Alt a 1* gene

PCR

## ABSTRACT

In this study, a PCR method based on oligonucleotide primers targeting the *Alt a 1* gene has been developed for the rapid detection of DNA from *Alternaria* spp. and for identification of *Alternaria alternata*, *Alternaria porri*, *Alternaria radicina*, and *Alternaria infectoria* species-groups in raw materials and processed food products. The assay design consists of two steps. First, a duplex PCR using primers Dir5cAlta1–Inv4Alta1 (that amplifies a specific DNA fragment of approximately 195 bp in all *Alternaria* spp.) and 18Sfweu–18Srveu (that amplifies a conserved 99 bp fragment on all the eukaryotic species), allows detection of *Alternaria* spp. DNA in foodstuffs with a high sensitivity and specificity. As a second step, identification of *Alternaria* species-groups is obtained through a seminested PCR method, without the need for sequencing PCR products. The specificity of the primer pairs designed was verified by PCR analysis of DNA from various *Alternaria* cultures, and also from several non target species. The detection limit of the method was approximately  $10^2$  CFU/ml, either in viable culture, heat inactivated culture or inoculated tomato pulp. Nevertheless, a sensitivity of  $10^3$  CFU/ml was obtained for tomato pulp inoculated with *A. alternata* or *A. porri* cultures heat inactivated at 90 °C for 5 min. PCR analysis of commercial foodstuff samples demonstrated the presence of DNA from *A. alternata* species-group in 100% of spoiled tomato samples, and 8% of tomato products, whilst 36.4% of cereal based infant food samples analyzed contained DNA from *A. infectoria* species-group.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The genus *Alternaria* is ubiquitous and includes both plant pathogenic and saprophytic species that may damage crops in the field or cause post harvest decay (Logrieco, Bottalico, Mulé, Moretti, & Perrone, 2003; Peever, Su, Carpenter-Boggs, & Timmer, 2004). Certain species are also capable of producing mycotoxins and pose a health hazard as they can contaminate raw or manufactured plant products like juices, sauces and preserves, thereby entering the human food chain (Ostry, 2008). Moreover, the genus *Alternaria* is considered to be one of the most prolific producers of fungal allergens. In particular, *Alt a 1*, the major allergen produced by *Alternaria* spp., has been associated with asthma, and recently, sensitivity to fungal allergens was shown to be a risk factor for life-threatening asthma (Cramer & Lawrence, 2003; Hong, Cramer, Lawrence, & Pryor, 2005; Hong, Maccaroni, Figuli, Pryor, & Belisario, 2006).

The classification of *Alternaria* species is very complex. Phylogenetic studies support grouping *Alternaria* species in several species-groups (Chou & Wu, 2002; Hong et al., 2005): 1) *A. alternata*

species-group includes species like *A. alternata*, *Alternaria arbor-escens*, *A. tenuissima*, *A. gaisen*, *A. citri*, and *A. longipes*. They produce mycotoxins like alternariol (AOH), alternariol methyl ether (AME) and tenuazonic acid (TeA) (Andersen, Kroger, & Roberts, 2001, 2002) and are responsible for extensive deterioration of plants and plant products, leading to considerable economic losses to growers and the food processing industry; 2) *A. porri* species-group includes species like *A. solani*, *A. porri*, *Alternaria dauci*, and *A. tomatophila*, that are responsible of foliar blights of carrots, onions, potatoes, and tomatoes and produce mycotoxins as AOH, altertoxins and alter-solanol (Andersen, Dongo, & Pryor, 2008); 3) *Alternaria radicina* species-group is considered one of the most important seed-borne pathogen on carrot and produce phytotoxic compounds as radicinin and radicinol (Konstantinova, Bonants, van Gent-Pelzer, van der Zouwen, & van den Bula, 2002; Solfrizzo et al., 2005; Tytkowska, 1992); and 4) *Alternaria infectoria* species-group affects cereal crops in the field and during storage, and produce metabolites like infectopyrones and novae-zelandins that are not found in other *Alternaria* species-groups (Andersen, Sorensen, Nielsen, van den Ende, & de Hoog, 2009; Christensen et al., 2005).

The current routine technique for detection and identification of *Alternaria* spp. often requires culture isolation and further morphological and physiological characterization (Simmons, 2007).

\* Corresponding author. Tel.: +34 913943747; fax: +34 913943743.  
E-mail address: [tgarcia@vet.ucm.es](mailto:tgarcia@vet.ucm.es) (T. García).



This process is tedious and time-consuming, whereby it takes at least days to weeks to obtain a diagnostic result. Moreover, because of the heat treatments used in food processing, viable microflora counts in the processed foodstuffs are extremely low, and traditional plating methods for the detection of microorganisms cannot be used (Zur, Shimoni, Hallerman, & Kashi, 2002). DNA methods, mainly based on the polymerase chain reaction (PCR), offer alternative approaches for detection of viable and not viable pathogenic and spoilage microorganisms in food. These methods have the advantages that the structure of DNA remains stable with physiological stages, and its composition does not depend on culture conditions. Moreover, DNA has regions with different degrees of variability that allow species-specific detection or the identification of wider taxonomic groups. A crucial requirement for successfully detecting specific microorganisms with a PCR assay is to choose adequate genetic markers during the primer design process that allow a high degree of specificity (Scheu, Berghof, & Stahl, 1998). The genetic markers used with this purpose are the internal transcribed spacers, ITS1 and ITS2 (Chou & Wu, 2002; Konstantinova et al., 2002; Zur et al., 2002), and protein-coding genes such as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) and *Alt a 1* (Hong et al., 2005).

*Alt a 1* gene encodes the major allergen produced by *A. alternata*, and *Alt a 1* gene homologs have been described in other species of the genus *Alternaria* (Hong et al., 2005). A comparison between *Alt a 1* homologous of several *Alternaria* species revealed greater sequence divergence than that found in similar comparisons of other ribosomal and protein-coding genes, such as the internal transcribed spacer (ITS), mitochondrial small subunit (mt SSU) rDNA, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gdp*) (Cramer & Lawrence, 2003; Hong et al., 2005; Pryor & Bigelow, 2003). The objective of this work was to develop PCR methods, based on the genetic marker *Alt a 1* for detection and identification of *Alternaria* species-groups in raw and processed foodstuffs.

## 2. Material and methods

### 2.1. Fungal strains and culture conditions

A total of 27 fungal strains were obtained from the CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands), the CECT (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain), the BCCM/MUCL (Mycothèque de l'Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium) and our own collection (Table 1). They were grown on Potato Dextrose Agar medium (PDA, Sigma, St. Louis, MO, USA), Malt Extract Agar (MEA) and Potato Carrot Agar (PCA, Sigma) for 7 days at 25 °C (Pitt & Hocking, 1997). Identification of *Alternaria* cultures was confirmed according to Simmons (2007). To determine the detection limit of the assay, *A. alternata* CBS 117143, *A. porri* CBS 109.41, *A. radicina* CBS 245.67 and *A. infectoria* CBS 210.86 were grown in malt extract broth for 4 days at 25 °C. Serial dilutions were used for DNA extraction and plated on Sabouraud-CAF (Liofilchem s.r.l., Roseto degli Abruzzi, Italy). Twenty milliliters of the *Alternaria* malt extract cultures were heated at 90 °C for 5 min and 20 ml at 60 °C for 30 min, to analyze the influence of thermal treatments on the assay performance.

### 2.2. DNA extraction

DNA was extracted from the fungal cultures grown in MEA, PDA and malt extract broth using the method described by Marek, Annamalai, and Venkitanarayan (2003). Briefly, the mycelium was resuspended in 500 µl of extraction buffer (Tris–HCl 200 mM pH 7.5, SDS 0.5% w/v, EDTA 25 mM, NaCl 250 mM) and 300 µl 3 M Na acetate. One hundred milligrams of 150–212 µ Glass Beads Acid-Washed

(Sigma) was added, and the mixture was vigorously agitated using a Vortex for 10 min. The resultant lysate was treated with 50 µl of 2 mg/ml proteinase K solution (Merck, Darmstadt, Germany), and incubated for 30 min at 37 °C in a water bath. Following incubation, 100 µl of 1.5 M NaCl was added to the lysate and mixed. After incubation for 5 min at room temperature, the mixture was centrifuged at 16,000g to separate out insoluble cell debris. The supernatant was transferred into a new tube and was extracted twice with an equal volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1). The DNA was precipitated by adding 0.6 volume of isopropanol and incubating at –20 °C for 1 h. The DNA was pelleted, washed with 70% ethanol, allowed to air dry, and finally resuspended in 100 µl of TE buffer (10 mM Tris and 1 mM EDTA, pH 8.0). DNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE).

DNA integrity was checked by agarose gel electrophoresis in a 1.5% low electroendosmosis D1 agarose gel (Pronadisa, Torrejón de Ardoz, Madrid, Spain) containing 1 µg/ml ethidium bromide in Tris–acetate buffer (TAE, 0.04 M Tris–acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0). Electrophoresis was performed at 25 °C, 85 V for 1 h.

Alternatively, DNA extraction was performed using the Wizard DNA Clean-up System (Promega Corp., Madison, WI). Briefly, two hundred milligrams of sample were homogenized with 860 µl of extraction buffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, and 1% SDS, pH 8.0), 100 µl of 5 M guanidine hydrochloride, and 40 µl of

**Table 1**

Sources of the fungal isolates used in this study and the accession numbers of their *Alt a 1* gene partial sequences.

Fungal	Strain	Host	GenBank–EMBL accession number
<i>Alternaria alternata</i>	CBS 154.31	<i>Staphylea trifolia</i>	
	CBS 117130	Potted strawberry tree ( <i>Arbutus unedo</i> )	FN689396
	CBS 117143	<i>Capsicum annuum</i> , fruits	FN689397
<i>A. arborescens</i>	CBS 109730	Tomato	FN689398
	MAP05 <sup>a</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN689414
<i>A. citri</i>	CBS 192.81	<i>Citrus sinensis</i> , fruit	FN689399
<i>A. dauci</i>	CBS 101592	Carrot seeds	FN689400
<i>A. gaisen</i>	CBS 632.93	Leaf spot in <i>Pyrus pyrifolia</i>	FN689401
<i>A. infectoria</i>	CBS 210.86	<i>Triticum</i>	FN689402
	MAP03 <sup>b</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN689415
	MAP04 <sup>b</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN689416
	MAP08 <sup>b</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN689417
<i>A. longipes</i>	CBS 917.96	<i>Nicotiana tabacum</i>	FN689403
<i>A. porri</i>	CBS 109.41	—	FN689404
<i>A. radicina</i> var. <i>radicina</i>	CBS 245.67	<i>Daucus carota</i>	FN689405
<i>A. solani</i>	CBS 347.79	Fruit rot in <i>Lycopersicon esculentum</i>	FN689406
<i>A. tenuissima</i>	CBS 880.95	<i>Fragaria vesca</i>	FN689407
	MAP01 <sup>c</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN689408
	MAP02 <sup>c</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN689409
	MAP06 <sup>c</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN689410
	MAP07 <sup>c</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN689411
	MAP09 <sup>c</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN689412
<i>Aspergillus ochraceus</i>	MAP10 <sup>c</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN689413
	MUCL 14207	Cotyledon, <i>Coffea robusta</i>	
<i>Fusarium oxysporum</i>	CECT 2866	Tomato	
<i>Penicillium expansum</i>	CECT 2278	Mould-fermented sausage	
<i>Rhizopus stolonifer</i>	CECT 2344	—	

<sup>a</sup> Member of the *A. arborescens* species-group based on morphology.

<sup>b</sup> Member of the *A. infectoria* species-group based on morphology.

<sup>c</sup> Member of the *A. tenuissima* species-group based on morphology.

20 mg/ml proteinase K, and incubated overnight at 55 °C with shaking at 200 rpm. Then, the samples were left to cool at room temperature. Five hundred microliters of chloroform (Sigma) were added to the lysate before centrifugation at 16,438g for 10 min. Genomic DNA from the clear aqueous supernatant obtained after the centrifugation (500 µl) was purified using the Wizard DNA Clean-up Kit, with a vacuum manifold, according to the manufacturer's instructions. The DNA was eluted in 100 µl of sterile deionised water.

### 2.3. Sample preparation for sensitivity assays

Five hundred grams of fresh tomatoes were scalded in boiling water, aseptically peeled off and the tomato pulp homogenized in a pre-sterilized blender. To assess the absence of fungal contamination, the tomato pulp samples were plated in Sabouraud-CAF, and incubated at 25 °C for 48 h. Moreover, 1 mL aliquots of tomato pulp were tested in triplicates by PCR using the *Alternaria* specific primers and amplification conditions described below. Samples that tested negative for *Alternaria* spp. by culture techniques and PCR methods were used for the inoculation experiment.

Samples of tomato pulp (0.9 ml) were inoculated with 0.1 ml of different *Alternaria* culture dilutions ( $10^5$ – $10^1$  CFU/ml). One milliliter non-inoculated aliquot was included as negative control.

DNA extraction from 1 mL samples of tomato pulp inoculated with *Alternaria* culture dilutions was carried out as described for *Alternaria* cultures. Moreover, tomato pulp samples and the culture dilutions used for inoculation were serially diluted in sterile phosphate-buffered saline (PBS; 136 mM NaCl, 1.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.09 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , and 2.6 mM KCl, pH 7.2) and plated on Sabouraud-CAF. Moulds were enumerated after incubation at 25 °C for 48 h.

### 2.4. Primers design

Two genus-specific and four species-group-specific primer pairs were designed (Fig. 1) based on *Alt a 1* gene sequences from *Alternaria* spp. available in the GenBank–European Molecular Biology Laboratory (GenBank–EMBL) database. Alignment of *Alt a 1* gene sequences obtained from *A. alternata* (accession number, AY563301), *A. arborescens* (AY563303), *A. argyranthemii* (AY563291), *A. brassicae* (AY563309), *Alternaria brassicicola* (AY563311), *A. capsici* (AY563298), *A. carotiincultae* (AY563287), *A. cetera* (AY563278), *A. cheiranthi* (AY563290), *A. cinerariae* (AY563308), *A. conjuncta* (AY563281), *A. crassa* (AY563293), *A. cucumerina* (AY563300), *A. dauci* (AY563292), *A. dumosa* (AY563305), *A. eryngii* (AY563313), *A. ethzedia* (AY563284), *A. euphorbiicola* (AY563314), *A. japonica* (AY563312), *A. limoniasperae* (AY563306), *A. longipes* (AY563304), *A. macrospora* (AY563294), *A. metachromatica* (AY563285), *A. mimicalata* (AY563310), *A. mouchaccae* (AY563279), *A. oregonensis* (AY563283), *A. petroselinii* (AY563288), *A. photistica* (AY563282), *A. porri* (AY563296), *A. pseudorostrata* (AY563295), *A. radicina* (AY563286), *A. solani* (AY563299), *A. sonchi* (AY563307), *A. smyrnii* (AY563289), *A. tagetica* (AY563297), and *A. tenuissima* (AY563302) was performed using the EMBOSS software package, version 2.2.0. Primer design was performed with the aid of Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Table 2 summarizes the sequences, combinations and description of the primers designed in this work, and the expected sizes of the amplicons obtained. Moreover, the primer Dir3Alta1 together with the reverse species-group-specific primers AinflAlta1 or AsolAlta1 was expected to amplify a DNA fragment of 97 bp in all *Alternaria* spp. Finally, the primer pair 18Sfweu–18Srveu, based on conserved 18S rRNA gene, was used as positive amplification control of the assay. These primers were expected to amplify a conserved region

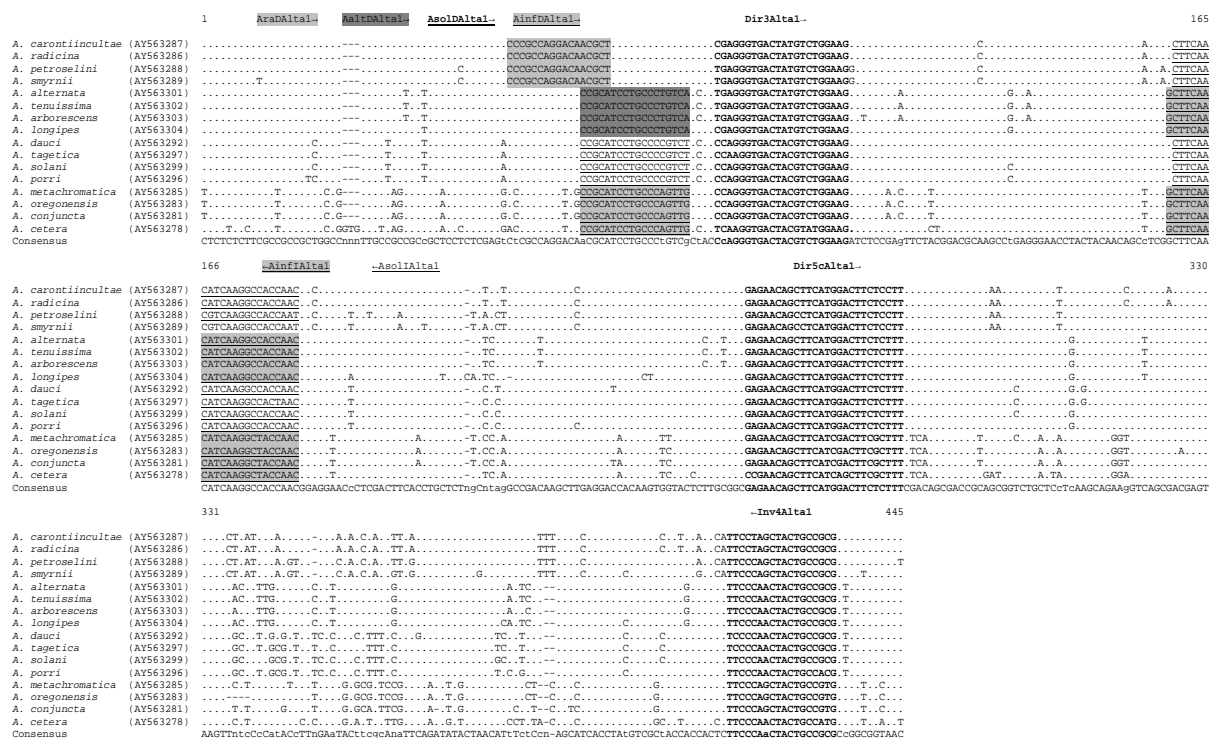


Fig. 1. DNA sequence alignment of the *Alt a 1* gene from several *Alternaria* species obtained from the GenBank–EMBL database. Boldfaced nucleotides indicate the position of primers Dir3Alta1, Dir5Alta1 and Inv4Alta1 used for amplification of DNA from *Alternaria* spp. Primers AinflAlta1, AsolAlta1, AraAlta1, AinflAlta1 and AsolAlta1 are underlined and/or shaded.



**Table 2**  
DNA sequences and descriptions of the primers used in this study.

Primers	Sequence (5'–3')	Primer combination	Primer concentration (pmol)	Primer annealing (°C)	Amplicon size (bp)	Used as
18Sfweu	AGGATCCATTGGAGGGCAAGT	18Sfweu/18Srveu	5/5	55	99	Positive amplificación control
18Srveu	TCCAACCTACGAGCTTTTAACTGCA					
Dir3Alta1	CGAGGGTGACTACGTCGGAAG	Dir3Alta1/Inv4Alta1	10/10	55	~350	Primers to sequence
		Dir3Alta1/AinflAlta1	10/10	65	97	Primers for seminested PCR
		Dir3Alta1/AsollAlta1	10/10	65	97	Primers for seminested PCR
Dir5cAlta1	GAGAACAGCTTCATGGACTTCCTTT	Dir5cAlta1/Inv4Alta1	20/20	55	~195	<i>Alternaria</i> spp. forward primer
Inv4Alta1	CGCGGCAGTAGTGGGAA					<i>Alternaria</i> spp. reverse primer
AaltDAlta1	CGCATCCTGCCCTGTCA	AaltDAlta1/AinflAlta1	10/10	65	118	<i>A. alternata</i> group-specific primers
AsolDAlta1	CGCATCCTGCCCGTCT	AsolDAlta1/AsollAlta1	10/10	65	118	<i>A. porri</i> group-specific primers
AinDAlta1	CGCATCCTGCCAGTTG	AinDAlta1/AinflAlta1	10/10	63	118	<i>A. infectoria</i> group-specific primers
AraDAlta1	CCCGCCAGGACAACGCT	AraDAlta1/AsollAlta1	10/10	63	131	<i>A. radicina</i> group-specific primers
AinflAlta1	GTTGGTAGCCTTGATGTTGAAGC					Group-specific reverse primer
AsollAlta1	GTTGGTGGCCTTGATGTTGAAG					Group-specific reverse primer

of 99 bp of the 18S rRNA gene in all the eukaryotic species (Martín et al., 2009).

## 2.5. PCR amplification

PCR amplification reactions were performed in a total volume of 25 µL. Each reaction mixture contained 10 ng of template DNA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM of each dNTP, the selected primers, and 1 U of *Tth* DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain) in a reaction buffer supplied with the enzyme. PCR amplification was performed in a Progene thermal cycler (Techné Ltd., Cambridge, UK) using the following conditions: an initial denaturation at 94 °C for 1 min, followed by 35 amplification cycles consisting of 30 s at 94 °C for DNA denaturation, 30 s for primer annealing, and 45 s at 72 °C for DNA extension. A final extension step at 72 °C for 5 min was also included. The annealing temperature and primer concentration were set as appropriate (Table 2), depending on the primer sets used in each reaction. Positive control amplifications were set using 5 pmol of 18Sfweu–18Srveu primers combined in duplex PCR with Dir5cAlta1–Inv4Alta1 primer pair.

PCR products (10 µL) were mixed with 2 µL of gel loading solution (Sigma), and analyzed by electrophoresis in 2% low endosmosis D1 agarose gel or 3.5% MS8 agarose gel (Pronadisa) containing 1 µg/ml ethidium bromide in TAE, and was visualized by UV transillumination using a Chemidoc XRS System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

## 2.6. Sequencing of PCR products

*Alt a 1* amplicons of the expected length (350 bp), obtained using oligonucleotides Dir3Alta1 and Inv4Alta1, were loaded in a 2% LM2 (Pronadisa) agarose gel containing 1 µg/ml ethidium bromide in TAE, and electrophoresed at 25 °C, 90 V for 70 min. Each DNA fragment was excised from the agarose gel under UV light using a sterile scalpel. The gel slice was purified with the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The concentration of the PCR products was estimated by agarose gel electrophoresis using a standard as reference marker (REAL, Durviz S.L., Valencia, Spain). A Chemidoc XRS System (Bio-Rad) was used for image analysis. Purified PCR products were sequenced at Sistemas Genómicos S.L. (Valencia, Spain). DNA sequencing was accomplished in an ABI Prism model 377 DNA sequencer (Applied Biosystems) using Dir3Alta1 and Inv4Alta1 primers with the dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems). The sequences obtained from the *Alternaria* strains used in this work were submitted to GenBank–EMBL database. Table 1 shows the

accession numbers assigned. The DNA sequences obtained from fungal strains or foodstuff samples were searched for homology to those available at the GenBank–EMBL database using the BLAST program (NCBI software package).

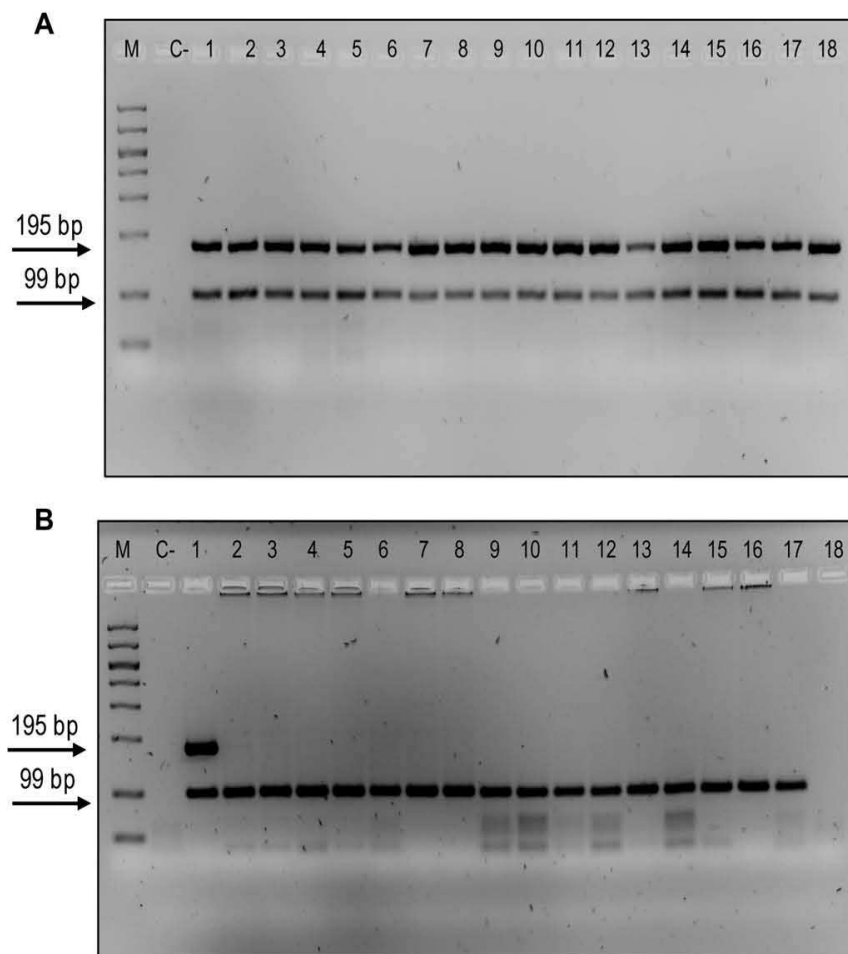
## 2.7. Detection limit of the PCR

Sensitivity assays were carried out using *Alternaria* spp. culture dilutions (either viable or heat treated as described above), and also using experimentally inoculated tomato pulp. Nine hundred microliters of tomato pulp samples were inoculated with 0.1 ml of *Alternaria* cultures with approximately 10<sup>5</sup> to 10<sup>1</sup> CFU/ml (determined by plate count in CAF-Sabouraud). Following DNA isolation from the *Alternaria* culture dilutions and inoculated tomato samples, the PCR reactions were carried out in triplicates in three independent experiments.

## 2.8. Analysis of commercial samples

Eleven fresh tomato fruits, 37 tomato products (6 sun-dried tomato, 2 tomato paste, 8 canned tomato, 7 ketchup, 12 tomato sauce and 2 ratatouille samples) and 11 cereal based infant food samples were purchased from several local supermarkets and retail shops located in Madrid (Spain). Samples were homogenized for 5 min in a stomacher (IUL Instruments, Barcelona, Spain), and the DNA extraction was carried out in triplicate using the Wizard DNA Clean-up System. Mould counts were determined by plating in Sabouraud-CAF. Duplex PCR reactions using *Alternaria* specific primers Dir5cAlta1–Inv4Alta1 and positive amplification control primers 18Sfweu–18Srveu were performed in triplicates. Samples that tested positive for *Alternaria* spp. DNA were further analyzed with the four group-specific primers in a seminested PCR reaction with primer Dir3Alta1 in order to identify the species-group of the *Alternaria* spp. present in the sample. Furthermore, the 350 bp amplicons obtained from the positive samples with primers Dir3Alta1–Inv4Alta1 were gel-purified and sequenced. The sequences obtained were compared with the GenBank–EMBL database, using the BLAST program and a dendrogram was constructed including sequences from *Alternaria* strains obtained from CBS and sequences from the database.

Phylogenetic analyses were conducted using the software MEGA version 4 (Tamura, Dudley, Nei, & Kumar, 2007). Confidence in the branching points was obtained by conducting 1000 bootstrap replicates using maximum-parsimony as the criterion (Felsenstein, 1985). The most parsimonious tree was obtained using the Close-Neighbor-Interchange algorithm (Nei & Kumar, 2000) with search level 7 in which the initial trees were obtained with the random addition of



**Fig. 2.** Electrophoretic analysis of *Alt a 1* PCR products obtained using *Alternaria* specific primers Dir5cAlt1–Inv4Alt1 combined with 18Sfweu–18Srveu positive amplification control primers. (A) Samples in lanes correspond to the following *Alternaria* species: *A. alternata* (1), *A. gaisen* (2), *A. dauci* (3), *A. longipes* (4), *A. citri* (5), *A. radicina* (6), *A. porri* (7), *A. solani* (8), *A. arborescens* (9–10), *A. tenuissima* (11–14), *A. infectoria* (15–18). (B) Samples included: *A. alternata* (1), *Rhizopus stolonifer* (2), *Penicillium expansum* (3), *Fusarium oxysporum* (4), *Aspergillus alutaceus* (5), *Saccharomyces cerevisiae* (6), Peanut (7), Oats (8), Soya (9), Tomato (10), Barley (11), Almond (12), Pistachio (13), Hazelnut (14), Goat (15), Hake (16), Chicken (17) and *Escherichia coli* (18). (C–) Negative Control. (M) Molecular weight Biomarker<sup>®</sup> Low (Invitrogen).

sequences (10 replicates). All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (Complete deletion option).

### 3. Results and discussion

*Alternaria* is a ubiquitous fungal genus and includes saprophytic, endophytic and pathogenic species. The cosmopolitan nature of small-spored *Alternaria* species makes them important in a broad range of disciplines. As saprophytic, they can spoil food products and animal feedstuffs by deterioration and by production of biological active compounds (Pitt & Hocking, 1997). As plant pathogens, they can cause serious problems in agriculture by reducing crop yield in the field and causing spoilage in storage. Moreover, there are species, mainly in the *A. alternata* species-group, that produce mycotoxins and allergens, which may cause problems in the food industry and agriculture as well as in health services (Andersen et al., 2001, 2002). Because of their different consequences for agriculture production and for human health, correct identification of *Alternaria* species-groups is essential and necessary.

Conventional tests used to detect *Alternaria* spp. in fruits, vegetables and oilseeds involve a combination of physiological and

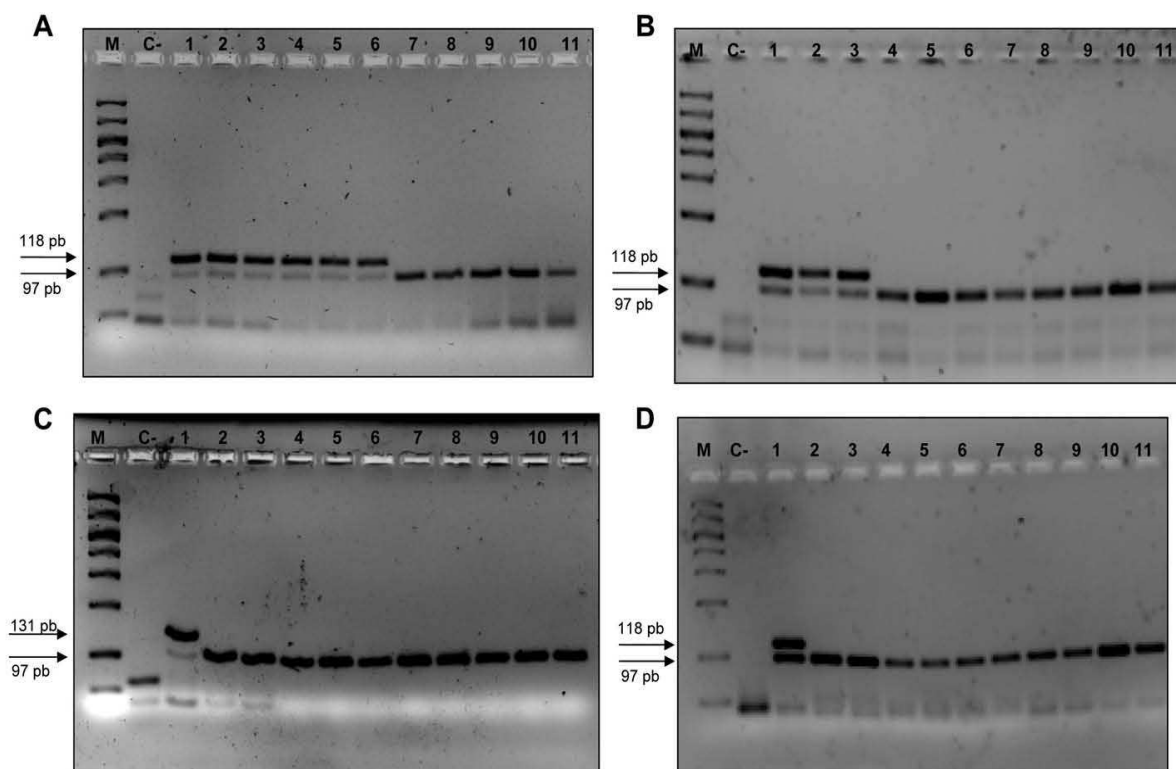
morphological characterization. However, the drawback of such methods is that *Alternaria* identification can be difficult, especially at low infection levels, and results may not be obtained for weeks, only allowing retrospective conclusions. Hence, there is a need for a sensitive and rapid test that could detect and identify *Alternaria* spp. in foodstuffs. Genetic methods offer alternative approaches for identification of food spoilage and pathogenic microorganisms, including *Alternaria* spp. (Chou & Wu, 2002; Hong et al., 2005; Konstantinova et al., 2002; Pryor & Gilbertson, 2000; Zur et al., 2002).

The *Alt a 1* gene was chosen in this study to develop a PCR-based system for rapid and specific detection and identification of *A. alternata*, *A. radicina*, *A. porri* and *A. infectoria* species-groups in processed foodstuff, because homologs of this gene have been described in several *Alternaria* species, with an appropriate degree of sequence divergence (Hong et al., 2005).

#### 3.1. Assay development and specificity

Alignment of *Alternaria* DNA sequences available in the GenBank–EMBL database, was performed using the EMBOSS software package. The detailed study of *Alt a 1* sequences from *Alternaria* spp.





**Fig. 3.** Electrophoretic analysis of *Alt a 1* PCR products obtained with primer Dir3Alta1 together with the species-group-specific primer pairs. (A) PCR products obtained with primers Dir3Alta1 and *A. alternata* group-specific primer pair (AaltDALta1–AinfiAlta1). Samples in lanes correspond to the following *Alternaria* species: *A. alternata* (1), *A. tenuissima* (2), *A. arborescens* (3), *A. gaisen* (4), *A. longipes* (5), *A. citri* (6), *A. porri* (7), *A. solani* (8), *A. dauci* (9), *A. radicina* (10), *A. infectoria* (11). (B) PCR products obtained with primers Dir3Alta1 and *A. radicina* group-specific primer pair (AraDALta1–AsoliAlta1). Samples included: *A. radicina* (1), *A. alternata* (2), *A. tenuissima* (3), *A. arborescens* (4), *A. gaisen* (5), *A. longipes* (6), *A. citri* (7), *A. porri* (8), *A. solani* (9), *A. dauc* (10), *A. infectoria* (11). (C) PCR products obtained with primers Dir3Alta1 and *A. porri* group-specific primer pair (AinfiDALta1–AsoliAlta1). Samples included: *A. porri* (1), *A. solani* (2), *A. dauci* (3), *A. alternata* (4), *A. tenuissima* (5), *A. arborescens* (6), *A. gaisen* (7), *A. longipes* (8), *A. citri* (9), *A. radicina* (10), *A. infectoria* (11). (D) PCR products obtained with primers Dir3Alta1 and *A. infectoria* group-specific primer pair (AinfiDALta1–AinfiAlta1). Samples in lanes correspond to the following *Alternaria* species: *A. infectoria* (1), *A. alternata* (2), *A. tenuissima* (3), *A. arborescens* (4), *A. gaisen* (5), *A. longipes* (6), *A. citri* (7), *A. porri* (8), *A. solani* (9), *A. dauci* (10), *A. radicina* (11). (C–) Negative control, (M) Molecular weight Biomarker® Low (Invitrogen).

allowed the design of the primer pair Dir5cAlta1–Inv4Alta1, that delimits a DNA fragment of approximately 195 bp in *Alternaria* spp. (Fig. 1). Specific 195 bp DNA fragments were successfully amplified from all 23 *Alternaria* strains analyzed. PCR results obtained from 18 *Alternaria* strains, corresponding to 11 species, are shown in Fig. 2A. No cross-species amplification was obtained from other fungal, bacterial, animal or plant species analyzed (Fig. 2B). To confirm the absence of PCR inhibition, duplex PCR was carried out combining the *Alternaria* specific primer pair with 18Sfweu–18Srveu primers. These primers successfully amplified a conserved 99 bp fragment on the 18S rRNA gene of all the eukaryotic species analyzed (Fig. 2A and B).

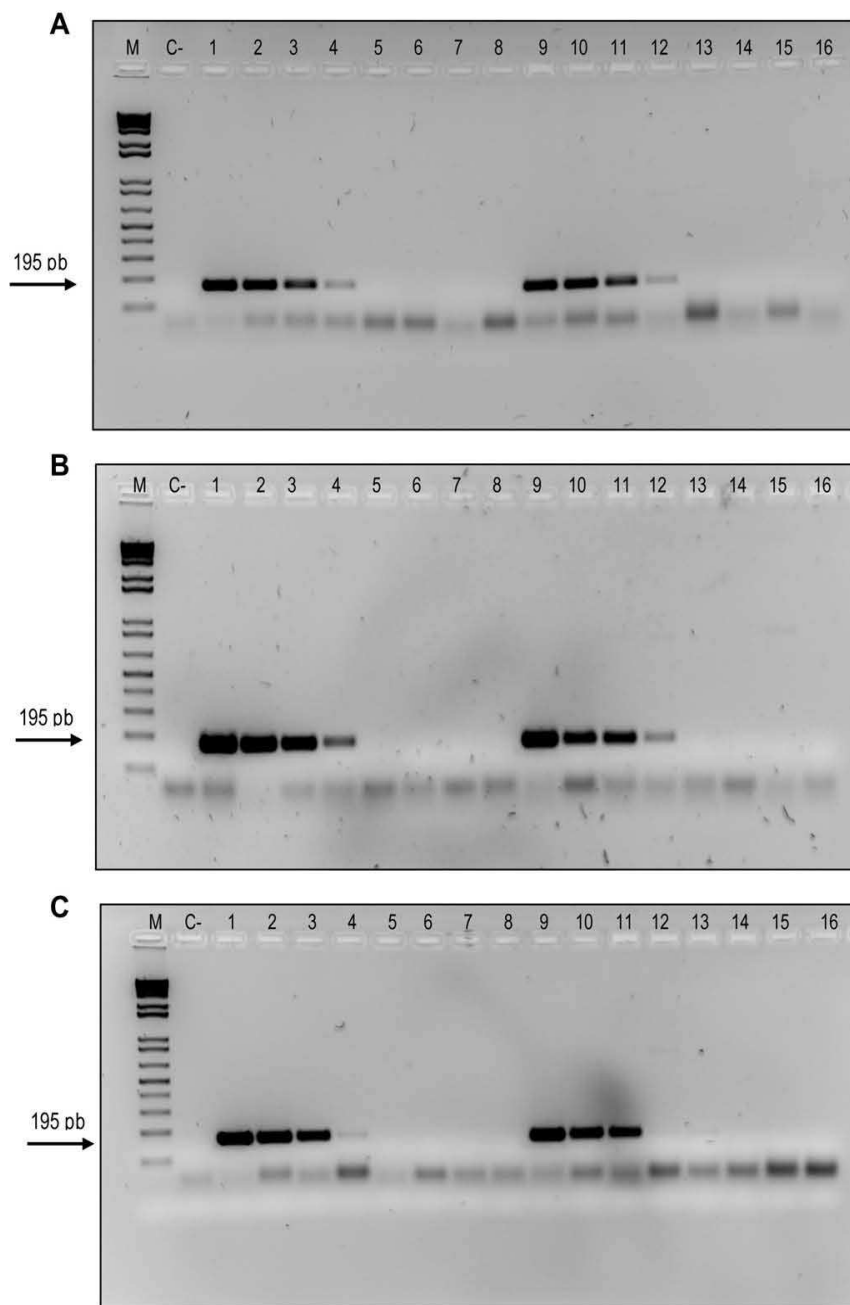
An additional primer, Dir3Alta1, was designed, that combined with Inv4Alta1 delimit a DNA fragment of approximately 350 bp (Fig. 1). The specific DNA fragment was amplified from all 23 *Alternaria* strains, and no amplification was obtained from other fungal, bacterial, animal or plant species analyzed (results not shown). The *Alt a 1* sequences obtained from the 23 *Alternaria* strains with oligonucleotides Dir3Alta1–Inv4Alta1 were compared with *Alt a 1* sequences available in the GenBank–EMBL database, using the BLAST program (NCBI software package). A hundred percent identity was found for each strain with sequences belonging to the same *Alternaria* species and to other *Alternaria* spp. belonging to the same species-group. Four primer pairs were designed to differentiate *Alternaria* species-groups,

AaltDALta1–AinfiAlta1 for the amplification of DNA from *A. alternata* group, AraDALta1–AsoliAlta1 for *A. radicina* group, AsolDALta1–AsoliAlta1 for *A. porri* group, and AinfiDALta1–AinfiAlta1 for *A. infectoria* group (Fig. 1).

Primers AaltDALta1–AinfiAlta1 amplified the 118 bp specific DNA fragment from strains included in *A. alternata* species-group (*A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. longipes*, *A. gaisen* and *A. citri*), showing no amplification on DNA from the *Alternaria* strains belonging to other *Alternaria* groups (Fig. 3A). Primers AsolDALta1–AsoliAlta1 amplified specifically a 118 bp DNA fragment from strains included in *A. porri* species-group (*A. porri*, *A. solani* and *A. dauci*). No cross-species-group amplification was obtained from other *Alternaria* strains analyzed (Fig. 3B). Similarly, the primer pairs AraDALta1–AsoliAlta1 and AinfiDALta1–AinfiAlta1 amplified exclusively DNA fragments of 131 bp and 118 bp from *A. radicina* and *A. infectoria*, respectively, showing no amplification from any other *Alternaria* spp. DNA tested (Fig. 3C and D). The primer Dir3Alta1 combined in a seminested PCR with each of the species-group-specific primer pairs amplified a DNA fragment of 97 bp from all *Alternaria* spp. analyzed (Fig. 3A–D).

### 3.2. Detection limit of PCR

Sensitivity assays were carried out using viable or heat inactivated *Alternaria* culture dilutions and also using experimentally



**Fig. 4.** Electrophoretic analysis of *Alt a 1* PCR products obtained with primers Dir5cAlta1-Inv4Alta1 from decimal dilutions of an *A. alternata* CBS 117143 culture, and from tomato pulp inoculated with different concentrations of *A. alternata*. (A) Viable culture. *A. alternata* counts in lanes 1–8 were, respectively,  $6 \times 10^5$ – $0.06$  CFU/ml. *Alternaria* counts in inoculated tomato pulp were  $1 \times 10^5$ – $0.1$  CFU/ml (lanes 9–15). (16) Non-inoculated tomato pulp. (B) Culture heated at  $60^\circ\text{C}/30$  min. *A. alternata* counts before heat treatment in lanes 1–8 were, respectively,  $5 \times 10^5$ – $0.05$  CFU/ml. *Alternaria* counts before heat treatment in inoculated tomato pulp were,  $3 \times 10^5$ – $0.03$  CFU/ml (lanes 9–16). (C) Culture heated at  $90^\circ\text{C}/5$  min. *A. alternata* counts before heat treatment in lanes 1–8 were, respectively,  $6 \times 10^5$ – $0.06$  CFU/ml. *Alternaria* counts before heat treatment in inoculated tomato pulp were,  $6 \times 10^4$ – $0.006$  CFU/ml (lanes 9–16). (C–) Negative control. (M) Molecular weight Biomarker® Low (Invitrogen).

inoculated tomato pulp. The detection limit (lowest dilution producing visible DNA amplification) of PCR with primers Dir5cAlta1-Inv4Alta1, using *A. alternata* culture dilutions, was approximately  $10^2$  CFU/ml, in viable *A. alternata* culture and experimentally inoculated tomato pulp (Fig. 4A). The detection limit was not modified after heat inactivation of the culture at  $60^\circ\text{C}$  for 30 min (Fig. 4B) or at  $90^\circ\text{C}$  for 5 min (Fig. 4C).

Sensitivity of the seminested PCR methods was tested using Dir3Alta1 combined with the four species-group-specific primers pairs, and DNA from *A. alternata* (Fig. 5A), *A. radicina* (Fig. 5C), *A. porri* (Fig. 5E) and *A. infectoria* (Fig. 5G) cultures, and from tomato pulp inoculated with those cultures. The detection limit for all *Alternaria* species-groups was close to  $10^2$  CFU/ml, and was not modified after heat inactivation of the cultures at  $60^\circ\text{C}$  for 30 min



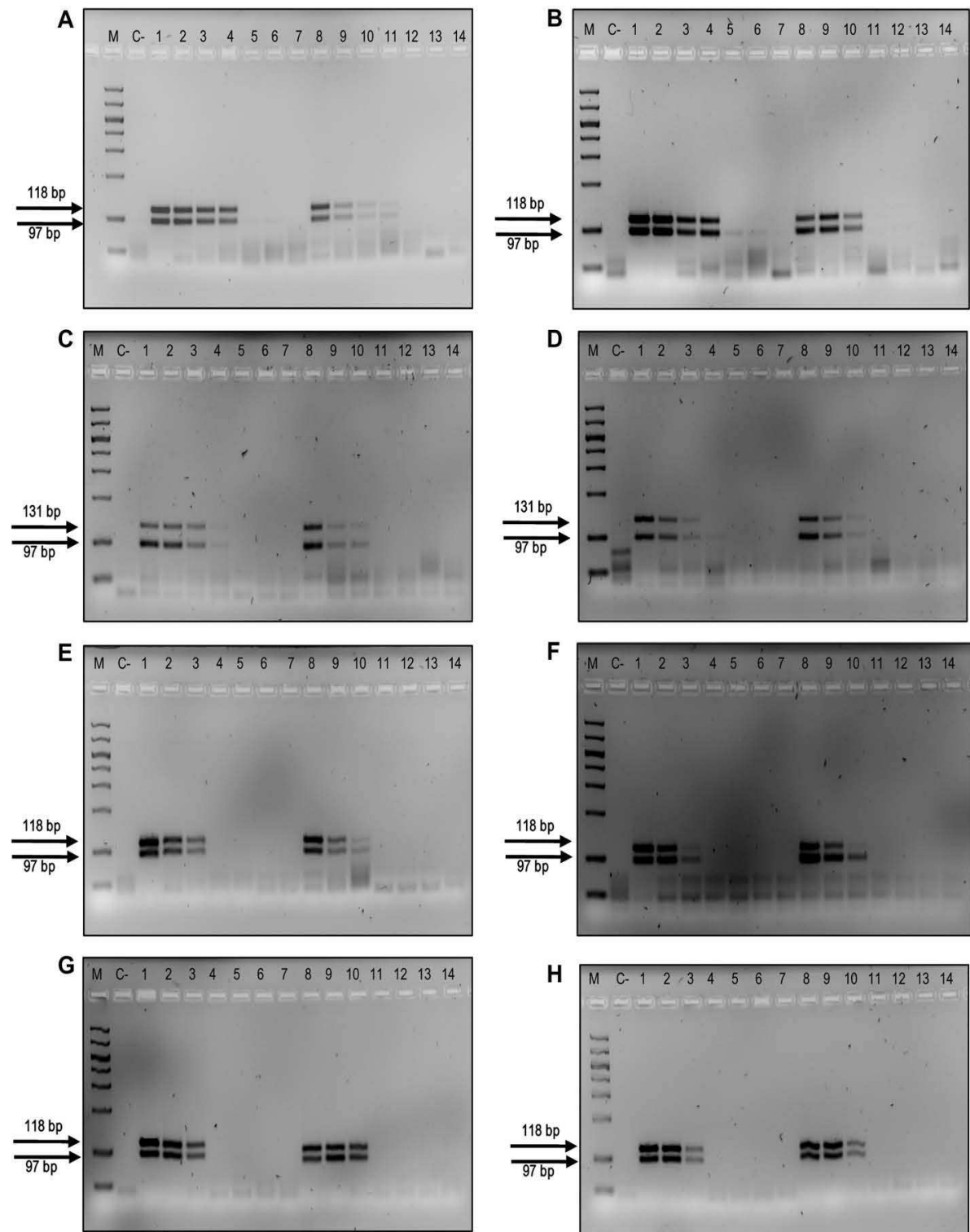


Fig. 5. Electrophoretic analysis of *Alt a 1* PCR products obtained with Dir3Alta1 together with the species-group-specific primer pairs from different concentrations of *A. alternata*, *A. radicina*, *A. porri* and *A. infectoria* cultures, and from tomato pulp inoculated with decimal dilutions of those cultures. (A) Viable culture. *A. alternata* counts in lanes 1–7 were, respectively  $6 \times 10^5$ –0.6 CFU/ml. *Alternaria* counts in inoculated tomato pulp were  $1 \times 10^2$ –1 CFU/ml (lanes 8–13). (14) Non-inoculated tomato pulp. (B) Culture heated at 90 °C/5 min. *A. alternata* counts before heat treatment in lanes 1–7 were, respectively,  $6 \times 10^5$ –0.6 CFU/ml. *Alternaria* counts before heat treatment in inoculated tomato pulp were  $1 \times 10^2$ –0.1 CFU/ml (lanes 8–14). (C) Viable culture. *A. radicina* counts in lanes 1–7 were, respectively,  $6.5 \times 10^4$ –0.065 CFU/ml. *Alternaria* counts in inoculated tomato pulp were  $1.6 \times 10^4$ –0.16 CFU/ml (lanes 8–13). (14) Non-inoculated tomato pulp. (D) Culture heated at 90 °C/5 min. *A. radicina* counts before heat treatment in lanes 1–7 were, respectively,

(results not shown) or at 90 °C for 5 min (Fig. 5D and H). However, the sensitivity was  $10^3$  CFU/ml for tomato pulp inoculated with *A. alternata* and *A. porri* cultures heat inactivated at 90 °C for 5 min (Fig. 5B and F). Detection of *Alternaria* DNA in cultures subjected to heat treatments and in heat treated food products has a great interest, because processed foodstuffs like juices, ketchup, sauces, or preserves containing *Alternaria* DNA reveal the use of damaged raw materials in their manufacture and perhaps the presence of mycotoxins, even though mould counts may be negative.

### 3.3. Analysis of commercial samples

The applicability of the method developed for detection and identification of DNA from *Alternaria* spp. in foodstuffs was assessed through analysis of raw and processed products. PCR analysis with primers Dir5cAlta1-Inv4Alta1, revealed the presence of *Alternaria* spp. DNA in 10 out of 59 samples analyzed (17%) (Table 3). Eleven tomato fruit samples were analyzed, 3 of which were spoiled fruits and 8 non-spoiled tomatoes. All the non-spoiled tomatoes tested negative in the *Alternaria* PCR assay, while the 3 spoiled ones tested positive (TA020, TA023, TA028). Regarding processed foodstuffs, three out of 37 tomato products (8%) and four out of 11 cereal based infant food samples (36.4%) were positive in the analysis of *Alternaria* spp. DNA.

Since many food products to be tested would not be contaminated with *Alternaria*, many PCR tests would not produce an amplification product. Hence, a positive control is important. A duplex PCR combining *Alternaria* specific together with control primers targeting a conserved eukaryotic sequence in the 18S rRNA gene was performed. 18Sfweu and 18Srveu primers successfully amplified a 99 bp fragment on the 18S rRNA gene of all samples analyzed, confirming that the samples where *Alternaria* DNA was not detected did not correspond to false negative results (Table 3).

The mould counts were positive in all spoiled tomato, with  $10^3$  CFU/g. Moreover, the mould counts in the two sun-dried tomato samples wrapped in plastic film (TA030 and TA031), were 100 CFU/g, showing that traditional methods for drying tomatoes offer environmental conditions appropriate for mould growth and mycotoxin production. The mould counts in the rest of tomato products were negative. All of them were hermetically sealed, heat treated products, packaged either in cans or in glass jars.

Samples that tested positive with *Alternaria* specific primers Dir5cAlta1-Inv4Alta1, were further analyzed with the four group-specific primers in a seminested PCR reaction with primer Dir3Alta1. The seminested PCR demonstrated that cereal based infant food positive samples (TA009, TA010, TA016, and TA018) were amplified with *A. infectoria* group-specific primers, showing no amplification with the other group-specific primers pairs; whereas the three spoiled tomatoes (TA020, TA023, and TA028) and the three positive tomato products (TA030, TA031, and TA050) were exclusively amplified with *A. alternata* group-specific primers (Table 3).

In order to confirm the identification of the *Alternaria* species detected in the commercial products, DNA from the samples that tested positive for *Alternaria* DNA were further analyzed with primers Dir3Alta1-Inv4Alta1. The 350 bp amplicons obtained from these samples were purified and sequenced in both directions, and the consensus sequences obtained were compared with DNA

sequences from the GenBank–EMBL database using the BLAST program. Sequencing and phylogenetic analysis of DNA variations of the PCR products obtained from *Alternaria* positive samples confirmed the results obtained with seminested-PCR. Sequence analysis demonstrated that DNA from *A. alternata* species-group was present in tomato samples and tomato products (TA020, TA023, TA028, TA030, TA031, and TA050) while DNA from *A. infectoria* species-group was detected in the cereal based infant food samples (TA009, TA010, TA016, and TA018). Phylogenetic analysis of the sequences obtained from samples, together with sequences from reference *Alternaria* spp., and from the GenBank–EMBL database, using MEGA 4.0, generated 1720 most-parsimonious trees from 304 positions of aligned DNA sequences, out of which 96 were parsimony informative. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates consisted of four different clades (Fig. 6). Clade I comprised the reference sequences belonging to the *A. alternata* group (*A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. gaisen*, *A. citri*, *A. longipes* and *A. arborescens*) together with those from the spoiled tomato samples and several tomato products analyzed in this survey (TA020, TA023, TA028, TA030, TA031, and TA050). The bootstrap of this clade indicated 98% unity. Clade II, with 100% bootstrap support, was formed by *A. porri*, *A. solani* and *A. dauci*. *A. infectoria* and *A. conjuncta* sequences clustered together with the cereal based infant food samples (TA009, TA010, TA016, and TA018) in clade III, with a bootstrap value of 100%. Finally, clade IV consisted of the *A. radicina* strains.

Detection of DNA from *A. alternata* species-group in commercial tomato products is important for food safety, because they produce mycotoxins like AOH, AME and TeA (Andersen et al., 2001, 2002) that can withstand food processing. They are also responsible for extensive deterioration of plants and plant products. Our results are in agreement with previous studies demonstrating that toxigenic *A. alternata*- group strains and associated tenuazonic acid and alternariols are commonly found in black mould of tomato, black rot of olive and citrus, black point of small cereals, core rot of apples, and black mould of several vegetables like sunflower, oilseed rape, pepper or melon (Logrieco et al., 2003; Pozzi et al., 2005; Serdani, Kang, Andersen, & Crous, 2002). However, chemical analysis to detect the above-mentioned mycotoxins in foodstuffs is cumbersome and expensive, while the PCR methods developed in this work are cheaper and can be performed in a working day, allowing retrieval of suspected products.

Analysis of cereal based infant food samples only showed contamination with the *A. infectoria* species-group. Other reports have also found this is the most prevalent *Alternaria* species in cereals (Andersen, Kroger, & Roberts, 2002; Andersen, Thrane, Svendsen, & Rasmussen, 1996; Dugan & Peever, 2002; Perelló, Moreno, & Sisterna, 2008; Perelló & Sisterna, 2006; Simmons, 1986, 2007). *A. infectoria* species-group has never shown to produce alternariols or tenuazonic acid or altersolanols (Andersen et al., 2008), but produces metabolites like infectopyrones and novae-zelandins that are not found in other *Alternaria* species-groups (Andersen et al., 2009; Christensen et al., 2005). Toxicity of these metabolites to humans has not been yet clearly established.

Because toxigenic *Alternaria* spp. and their mycotoxins have been frequently found in several agricultural commodities and also in processed foodstuff (Logrieco et al., 2003), their presence should

$6.5 \times 10^4$ – $0.065$  CFU/ml. *Alternaria* counts before heat treatment in inoculated tomato pulp were  $1.6 \times 10^4$ – $0.016$  CFU/ml (lanes 8–14). (E) Viable culture. *A. porri* counts in lanes 1–7 were, respectively  $8 \times 10^4$ – $0.08$  CFU/ml. *Alternaria* counts in inoculated tomato pulp were  $1.5 \times 10^4$ – $0.15$  CFU/ml (lanes 8–13). (14) Non-inoculated tomato pulp. (F) Culture heated at 90 °C/5 min. *A. porri* counts before heat treatment in lanes 1–7 were, respectively,  $8 \times 10^4$ – $0.08$  CFU/ml. *Alternaria* counts before heat treatment in inoculated tomato pulp were  $1.5 \times 10^4$ – $0.015$  CFU/ml (lanes 8–14). (G) Viable culture. *A. infectoria* counts in lanes 1–7 were, respectively,  $5.5 \times 10^4$ – $0.055$  CFU/ml. *Alternaria* counts in inoculated tomato pulp were  $1.6 \times 10^4$ – $0.16$  CFU/ml (lanes 8–13). (14) Non-inoculated tomato pulp. (H) Culture heated at 90 °C/5 min. *A. infectoria* counts before heat treatment in lanes 1–7 were, respectively,  $5.5 \times 10^4$ – $0.055$  CFU/ml. *Alternaria* counts before heat treatment in inoculated tomato pulp were  $1.6 \times 10^4$ – $0.016$  CFU/ml (lanes 8–14). (C–) Negative control, (M) Molecular weight Biomarker<sup>®</sup> Low (Invitrogen).



**Table 3**

Results for the PCR analysis of foodstuffs.

Sample identification	Type of product	Dir5cAlta1 Inv4Alt	AaltDAlta1 AinfAlta1	AraDAlta1 AsolAlta1	AsolDAlta1 AsolAlta1	AinfDAlta1 AinfAlta1	Dir3Alta1 AinfAlta1	Dir3Alta1 AsolAlta1	18Sfweu 18Srveu
TA008	Cereal based infant food A	— <sup>a</sup>	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA009	Cereal based infant food B	~195 bp	—	—	—	118 bp	97 bp	—	99 bp
TA010	Cereal based infant food C	~195 bp	—	—	—	118 bp	97 bp	—	99 bp
TA011	Cereal based infant food D	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA012	Cereal based infant food E	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA013	Cereal based infant food F	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA014	Cereal based infant food G	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA015	Cereal based infant food H	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA016	Cereal based infant food I	~195 bp	—	—	—	118 bp	97 bp	—	99 bp
TA017	Cereal based infant food J	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA018	Cereal based infant food K	~195 bp	—	—	—	118 bp	97 bp	—	99 bp
TA019	Non-spoiled tomato A	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA020	Spoiled tomato A	~195 bp	118 bp	—	—	—	—	—	99 bp
TA021	Non-spoiled tomato B	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA022	Non-spoiled tomato C	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA023	Spoiled tomato B	~195 bp	118 bp	—	—	—	—	—	99 bp
TA024	Non-spoiled tomato D	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA025	Non-spoiled tomato E	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA026	Non-spoiled tomato F	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA027	Non-spoiled tomato G	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA028	Spoiled tomato C	~195 bp	118 bp	—	—	—	97 bp	—	99 bp
TA029	Non-spoiled tomato H	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA030	Sun-dried tomato A (dry-packed)	~195 bp	118 bp	—	—	—	97 bp	—	99 bp
TA031	Sun-dried tomato B (dry-packed)	~195 bp	118 bp	—	—	—	97 bp	—	99 bp
TA032	Tomato paste A	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA033	Tomato paste B	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA034	Canned tomato A	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA035	Canned tomato B	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA036	Ketchup A	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA037	Ketchup B	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA038	Ketchup C	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA039	Ketchup D	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA040	Ketchup E	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA042	Tomato sauce A	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA043	Tomato sauce B	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA044	Tomato sauce C	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA045	Tomato sauce D	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA046	Tomato sauce E	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA047	Tomato sauce F	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA048	Ratatouille A	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA049	Ratatouille B	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA050	Tomato sauce G	~195 bp	118 bp	—	—	—	97 bp	—	99 bp
TA051	Tomato sauce H	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA052	Canned tomato C	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA053	Canned tomato D	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA055	Sun-dried tomato (in oil) C	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA056	Sun-dried tomato D (in oil)	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA057	Sun-dried tomato E (in oil)	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA058	Sun-dried tomato F (in oil)	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA059	Tomato sauce I	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA060	Tomato sauce J	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA061	Tomato sauce K	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA062	Canned tomato E	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA063	Canned tomato F	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA065	Canned tomato G	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA066	Canned tomato H	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA067	Tomato sauce L	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA068	Ketchup F	—	—	—	—	—	—	—	99 bp
TA069	Ketchup G	—	—	—	—	—	—	—	99 bp

<sup>a</sup> Means no amplification of the PCR product.

be included as an important aspect in Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) plans of food industries that manufacture these products.

Application of preventive and control strategies for *Alternaria* mycotoxins from field-to-table requires the development of rapid, sensitive and specific analytical methods that could be applied at preharvest stages, and also in raw materials and processed foodstuffs. The combined use of the duplex and seminested PCR assays developed in this work is a fast, specific and sensitive method for detection and identification of DNA from the different *Alternaria*

species-groups in raw materials and processed food products. The presence of DNA in the foodstuffs analyzed does not necessarily lead to mycotoxins production. However, some authors have reported a positive correlation between the PCR detection of DNA from *Fusarium culmorum* and the presence of nivalenol in cereal samples (Pasquali et al., 2010). Also, Sarlin et al. (2006) have reported a correlation between the *F. graminearum* DNA level and the deoxynivalenol content in north American barley and malt samples. A positive PCR result for mycotoxigenic *Alternaria* species-groups can therefore be taken as an indication of the use of low

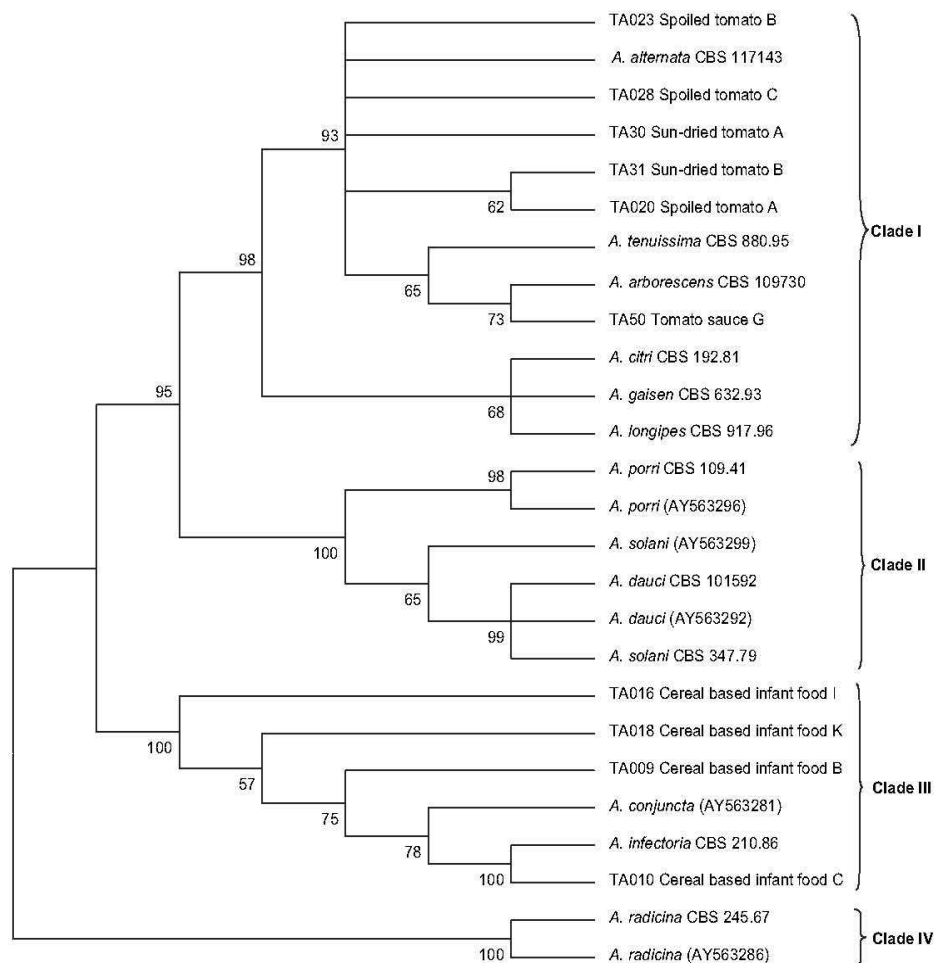


Fig. 6. Maximum-parsimony consensus tree based on sequences of the *Alt1* gene of *Alternaria* species and PCR sequences obtained with *Alternaria* specific primers Dir3Alt1a1-Inv4Alt1a1 from commercial foodstuff samples. Bootstrap values based on 1000 replications are indicated as percentages next to the branches when replication frequencies exceed 50%. Codes between brackets refer to sequences from GenBank–EMBL.

quality raw materials, and also the potential presence of *Alternaria* mycotoxins in the final products that should be analyzed further.

In conclusion, this assay could be useful as a screening method for the routine detection and identification of *Alternaria* spp, and could be used as a quality and biosecurity marker of raw materials and final products in the fruits, vegetables and cereals processing industries.

#### Acknowledgements

This study was supported by Grant No. AGL 2006-07659 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the Programa de Vigilancia Sanitaria 2009/AGR-1489 from the Comunidad de Madrid (Spain). Miguel Ángel Pavón and Nicolette Pegels are recipients of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

The authors would like to thank Dr. Birgitte Andersen (Systems Biology, Technical University of Denmark) for her help with the morphological identification of *Alternaria* cultures.

#### References

Andersen, B., Dongo, A., & Pryor, B. M. (2008). Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. tomatophila*. *Mycological Research*, 112, 241–250.

- Andersen, B., Kroger, E., & Roberts, R. G. (2001). Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen*, and *A. longipes*. *Mycological Research*, 105, 291–299.
- Andersen, B., Kroger, E., & Roberts, R. G. (2002). Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria*, and *A. tenuissima* species-groups. *Mycological Research*, 106, 170–182.
- Andersen, B., Sorensen, J. L., Nielsen, K. E., van den Ende, B. G., & de Hoog, S. (2009). A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectoria* species-group. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 642–656.
- Andersen, B., Thrane, U., Svendsen, A., & Rasmussen, I. A. (1996). Associated field mycobiota on malt barley. *Canadian Journal of Botany*, 74, 854–858.
- Chou, H., & Wu, W. (2002). Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. *Mycological Research*, 106, 164–169.
- Christensen, K. B., van Klink, J. W., Weavers, R. T., Larsen, T. O., Andersen, B., Phipps, R. K., et al. (2005). Novel chemotaxonomic markers for the *Alternaria infectoria* species-group. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9431–9435.
- Cramer, R. A., & Lawrence, C. B. (2003). Cloning of a gene encoding an Alt 1 isoallergen differentially expressed by the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola* during *Arabidopsis* infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2361–2364.
- Dugan, F. M., & Peever, T. L. (2002). Morphological and cultural differentiation of described species of *Alternaria* from Poaceae. *Mycotaxon*, 83, 229–264.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783–791.
- Hong, S. G., Cramer, R. A., Lawrence, C. B., & Pryor, B. M. (2005). Alt 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genetics and Biology*, 42, 119–129.
- Hong, S. G., Maccaroni, M., Figuli, P. J., Pryor, B. M., & Belisario, A. (2006). Polyphasic classification of *Alternaria* isolated from hazelnut and walnut fruit in Europe. *Mycological Research*, 110, 1290–1300.

- Konstantinova, P., Bonants, P., van Gent-Pelzer, M., van der Zouwen, P., & van den Bula, R. (2002). Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. *Mycological Research*, 106, 23–33.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, M., Moretti, A., & Perrone, G. (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 645–667.
- Marek, P., Annamalai, T., & Venkitanarayan, K. (2003). Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*, 89, 139–144.
- Martin, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Pegels, N., Hernández, P. E., et al. (2009). SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. *Meat Science*, 82, 252–259.
- NCBI. (2009). National center for biotechnology information. Basic local alignment search tool. Available at: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press.
- Ostry, V. (2008). *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*, 1, 175–188.
- Pasquali, M., Giraud, F., Brochot, C., Cocco, E., Hoffmann, L., Bohn, T., et al. (2010). Genetic *Fusarium* chemotyping as a useful tool for predicting nivalenol contamination in winter wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 246–253.
- Peever, T. L., Su, G., Carpenter-Boggs, L., & Timmer, L. W. (2004). Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. *Mycologia*, 96, 119–134.
- Perelló, A. E., Moreno, M., & Sisterna, M. N. (2008). *Alternaria infectoria* species—group associated with black point of wheat in Argentina. *Plant Pathology*, 57, 379.
- Perelló, A. E., & Sisterna, M. N. (2006). Leaf blight of wheat caused by *Alternaria tritici* in Argentina. *Plant Pathology*, 55, 303.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (1997). *Fungi and food spoilage*. London: Blackie Academic and Professional.
- Pozzi, C. R., Braghini, R., Arcaro, J., Zorzete, P., Israel, A. L., Pozar, I. O., et al. (2005). Mycoflora and occurrence of alternariol and alternariol monomethyl ether in Brazilian sunflower from sowing to harvest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5824–5828.
- Pryor, B., & Gilbertson, R. L. (2000). Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research*, 104, 1312–1321.
- Pryor, B., & Bigelow, D. (2003). Molecular characterization of *Embellisia* and *Nimbya* species and their relationship to *Alternaria*, *Ulocladium* and *Stemphylium*. *Mycologia*, 95, 1141–1154.
- Sarlin, T., Yli-Mattila, T., Jestoi, M., Rizzo, A., Paavananen-Huhtala, S., Haikara, A., et al. (2006). Real-time PCR for quantification of toxigenic *Fusarium* species in barley and malt. *European Journal of Plant Pathology*, 114, 371–380.
- Scheu, P., Berghof, M. K., & Stahl, U. (1998). Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction. *Food Microbiology*, 15, 13–31.
- Serdani, M., Kang, J., Andersen, B., & Crous, P. (2002). Characterisation of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycological Research*, 106, 561–569.
- Simmons, E. G. (1986). *Alternaria* themes and variations. *Mycotaxon*, 25, 287–308, (22–26).
- Simmons, E. G. (2007). *Alternaria. An identification manual*. Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre.
- Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Vittì, C., Tytkowska, K., Grabarkiewicz-Szczesna, J., Szopinska, D., et al. (2005). Toxigenic profile of *Alternaria alternata* and *Alternaria radicina* occurring on umbelliferous plants. *Food Additives and Contaminants*, 22, 302–308.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596–1599.
- Tytkowska, K. (1992). Carrot seed-borne diseases caused by *Alternaria* species. In J. Chelkowski, & A. Visconti (Eds.), *Alternaria: Biology, plant diseases and metabolites* (pp. 337–352). Amsterdam: Elsevier Scientific Publishers.
- Zur, G., Shimoni, E. M., Hallerman, E., & Kashi, Y. (2002). Detection of *Alternaria* fungal contamination in cereal grains by a polymerase chain reaction-based assay. *Journal of Food Protection*, 65, 1433–1440.

## PCR Detection of *Alternaria* spp. in Processed Foods, Based on the Internal Transcribed Spacer Genetic Marker

MIGUEL ÁNGEL PAVÓN, ISABEL GONZÁLEZ, MARÍA ROJAS, NICOLETTE PEGELS, ROSARIO MARTÍN, AND TERESA GARCÍA\*

*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain*

MS 10-110: Received 12 March 2010/Accepted 28 June 2010

### ABSTRACT

The genus *Alternaria* is considered one of the most important fungal contaminants of vegetables, fruits, and cereals, producing several mycotoxins that can withstand food processing methods. Conventional methods for *Alternaria* identification and enumeration are laborious and time-consuming, and they might not detect toxigenic molds inactivated by food processing. In this study, a PCR method has been developed for the rapid identification of *Alternaria* spp. DNA in foodstuffs, based on oligonucleotide primers targeting the internal transcribed spacer (ITS) 1 and ITS2 regions of the rRNA gene. The specificity of the *Alternaria*-specific primer pair designed (Dir1ITSAlt-Inv1ITSAlt) was verified by PCR analysis of DNA from various *Alternaria* spp., and also from several fungal, bacterial, yeast, animal, and plant species. The detection limit of the method was  $10^2$  CFU/ml in viable culture, heated culture, or experimentally inoculated tomato pulp. The applicability of the method for detection of *Alternaria* spp. DNA in foodstuffs was assessed by testing several commercial samples. *Alternaria* DNA was detected in 100% of spoiled tomato samples, 8% of tomato products, and 36.4% of cereal-based infant food samples analyzed.

*Alternaria* is a cosmopolitan fungal genus that includes saprophytic, endophytic, and pathogenic species (25). Plant pathogenic species affect cereals, vegetables, and fruit crops in the field (7), and during storage (16, 27). *Alternaria* contamination is responsible for some of the world's most devastating plant diseases, causing serious reduction of crop yields and considerable economic losses to growers and the food processing industry. There are about 60 known *Alternaria* spp., many of which produce metabolites toxic to plants and mammals (39). The major *Alternaria* mycotoxins belong to three structural classes: the tetramic acid derivative, tenuazonic acid (TeA); the dibenzopyrone derivatives, alternariol (AOH), alternariol mono-methyl ether (AME), and altenuene (ALT); and the perylene derivatives, the altertoxins (7). These mycotoxins may pose a health hazard as they can contaminate manufactured products like juices, sauces, and preserves. Exposure to *Alternaria* toxins has been linked to a variety of adverse health effects. The toxicity of TeA has been reported in plants, in chick embryos, and several animal species (6). In dogs, it caused hemorrhages in several organs at daily doses of 10 mg/kg of body weight, and in chickens, subacute toxicity was observed with 10 mg/kg in the feed. Moreover, sorghum grain contaminated with TeA was associated with the human hematological disorder known as onyalai (23). Altertoxin I is acutely toxic in mice, as well as being

mutagenic and cytotoxic to bacterial and mammalian cells (33). AOH and AME are mutagenic and cytotoxic to bacterial and mammalian cells, and are suspected to be carcinogenic. Both AOH and AME cause weakly acute toxicity but show synergistic effects (18). In addition, Liu et al. (15) reported a correlation between the presence of AME and AOH in cereal grain, and the high incidence of human esophageal cancer.

Because of the high number and chemical diversity of the mycotoxins produced by *Alternaria* spp., the detection of all of them in food products or raw materials is neither practical nor realistic, as it would be highly laborious and expensive. Moreover, conventional laboratory methods for detection and identification of fungi often require culture isolation and rely on a variety of morphological and physiological tests. This process is tedious and time-consuming, taking from days to weeks (37). For this reason, an interesting approach that would allow an indirect estimation of the presence of mycotoxins in raw materials or processed food consists of the detection of viable and nonviable *Alternaria* spp. in these foods by using rapid methods.

Advances in molecular biology have allowed the development of new fungal identification and detection techniques based on DNA analysis. These methods have several advantages: the structure of DNA remains stable with physiological stages, its composition does not depend on cultural conditions, and it has regions with different degrees of variability that allow species-specific identifica-

\* Author for correspondence. Tel: 34-913943747; Fax: 34-913943743; E-mail: tgarcia@vet.ucm.es.



TABLE 1. Strains used in this study, their sources, and the accession numbers of their ITS partial sequences

Species	Strain	Source/origin	GenBank-EMBL accession no.
<i>Alternaria alternata</i>	CBS 154.31	<i>Staphylea trifolia</i>	FM958519
	CBS 117130	Potted strawberry tree ( <i>Arbutus unedo</i> )	FM958520
	CBS 117143	<i>Capsicum annuum</i> , fruits	FM958521
<i>A. arborescens</i>	CBS 109730	Tomato	FM958522
	MAP05 <sup>a</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN668748
<i>A. citri</i>	CBS 192.81	<i>Citrus sinensis</i> , fruit	FM958523
<i>A. dauci</i>	CBS 101592	Carrot seeds	FM958524
<i>A. gaisen</i>	CBS 632.93	Leaf spot in <i>Pyrus pyrifolia</i>	FM958525
<i>A. infectoria</i>	CBS 210.86	<i>Triticum</i>	FM958526
	MAP03 <sup>b</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN668746
	MAP04 <sup>b</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN668747
	MAP08 <sup>b</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN668751
<i>A. longipes</i>	CBS 917.96	<i>Nicotiana tabacum</i>	FM958527
<i>A. porri</i>	CBS 109.41		FM958528
<i>A. radicina</i> var. <i>radicina</i>	CBS 245.67	<i>Daucus carota</i>	FM958529
<i>A. solani</i>	CBS 347.79	Fruit rot in <i>Lycopersicon esculentum</i>	FM958530
<i>A. tenuissima</i>	CBS 880.95	<i>Fragaria vesca</i>	FM958531
	MAP01 <sup>c</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN668744
	MAP02 <sup>c</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN668745
	MAP06 <sup>c</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN668749
	MAP07 <sup>c</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN668750
	MAP09 <sup>c</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN668752
	MAP10 <sup>c</sup>	<i>Triticum</i> , grain	FN668753
<i>Aspergillus ochraceus</i>	MUCL 14207	Cotyledon, <i>Coffea robusta</i>	
<i>Fusarium oxysporum</i>	CECT 2866	Tomato	
<i>Penicillium expansum</i>	CECT 2278	Mold-fermented sausage	
<i>Rhizopus stolonifer</i>	CECT 2344		

<sup>a</sup> Member of the *A. arborescens* species group, based on morphology.

<sup>b</sup> Member of the *A. infectoria* species group, based on morphology.

<sup>c</sup> Member of the *A. tenuissima* species group, based on morphology.

tion or the detection of wider taxonomic groups. Various methods utilizing DNA have been developed for the detection of specific fungal genera and species in food (22). Among these methods, PCR-based assays are specific, can be extremely sensitive, and results are obtained in a few hours. PCR amplification and sequence comparison of ribosomal coding genes, such as the internal transcribed spacer 1 (ITS1) and ITS2 regions, and the mitochondrial small subunit rDNA, have offered a new tool for the identification and classification of foodborne fungi. The interest in rRNA is because ribosomes are present in all organisms, and the genes coding for rRNA occur as tandem repeats, with 100 to 200 copies per genome. Moreover, some rRNA sequences are highly homologous for all organisms, enabling alignment of less conserved regions for the detection of specific groups of microorganisms. The ribosomal gene sequences, particularly the internal transcribed spacer regions ITS1 and ITS2, have been used to study the phylogeny of *Alternaria* species (8, 14, 31, 35). This genetic marker has been also used to detect some *Alternaria* spp. in several agricultural commodities (13, 38, 39). The objective of this research was to develop a PCR method based on the ITS genetic marker for detection and identification of *Alternaria* spp. in raw and processed fruits, vegetables, and cereals, which could be used as a marker for the quality of raw materials and the biosafety of raw and processed food products.

## MATERIALS AND METHODS

**Fungal strains and culture conditions.** A total of 27 fungal strains were obtained from the Centraalbureau voor Schimmelfcultures (CBS; Utrecht, The Netherlands), the Colección Española de Cultivos Tipo (CECT; Valencia, Spain), the Mycothèque de l'Université catholique de Louvain (MUCL; Louvain-la-Neuve, Belgium), and our own collection (MAP) (Table 1). They were grown on potato dextrose agar medium (Sigma, St. Louis, MO), malt extract agar, and potato carrot agar (Sigma) at 25°C for 7 days (27). Identification of *Alternaria* cultures was confirmed according to the method of Simmons (32). To determine the detection limit of the assay, *A. alternata* CBS 117143, *A. porri* CBS 109.41, *A. radicina* CBS 245.67, and *A. infectoria* CBS 210.86 were grown in malt extract broth at 25°C for 4 days. Serial dilutions were used for DNA extraction and plated on Sabouraud-CAF (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy). Twenty milliliters of the *Alternaria* malt extract cultures was heated at 90°C for 5 min and 20 ml at 60°C for 30 min to analyze the influence of thermal treatments on the assay performance. These treatments were chosen because they are similar to those usually applied in the tomato processing industry (12).

**DNA extraction.** DNA was extracted from the fungal cultures grown in malt extract agar, potato dextrose agar medium, and malt extract broth at 25°C for 7 days by using the method described by Marek et al. (17). Briefly, the mycelial mat was harvested from the surface of the agar with a sterile disposable loop and aseptically transferred into a 2-ml microcentrifugation tube. Five hundred microliters of extraction buffer (200 mM Tris-HCl

[pH 7.5], 0.5% [wt/vol] sodium dodecyl sulfate [SDS], 25 mM EDTA, 250 mM NaCl) and 300 µl of 3 M sodium acetate were added to the tube containing either the harvested mycelial mat or 1 ml of homogenized mold broth culture. One hundred milligrams of 150- to 212-µm acid-washed glass beads (Sigma) was added, and the mixture was vigorously agitated with a vortex for 10 min. The resultant lysate was treated with 50 µl of 2 mg/ml proteinase K solution (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated at 37°C for 30 min in a water bath. After incubation, 100 µl of 1.5 M NaCl was added to the lysate and mixed. After incubation at room temperature for 5 min, the mixture was centrifuged at  $16,000 \times g$  to separate out insoluble cell debris. The supernatant was transferred into a new tube and was extracted twice with an equal volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1). The DNA was precipitated by adding 0.6 volume of isopropanol and incubating at -20°C for 1 h. The DNA was pelleted, washed with 70% ethanol, allowed to air dry, and finally resuspended in 100 µl of 10 mM Tris and 1 mM EDTA (pH 8). DNA concentration was measured with an ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Montchanin, DE).

DNA integrity was checked by agarose gel electrophoresis in a 1.5% low electroendosmosis D1 agarose gel (Pronadisa, Torrejón de Ardoz, Madrid, Spain) containing 1 µg/ml ethidium bromide in Tris-acetate-EDTA (TAE, pH 8.0) buffer. Electrophoresis was done at 85 V for 1 h.

Alternatively, DNA extraction was done with the Wizard DNA Clean-Up System (Promega Corp., Madison, WI). In brief, 200 mg of sample was homogenized with 860 µl of extraction buffer (pH 8.0; 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, and 1% SDS), 100 µl of 5 M guanidine hydrochloride, and 40 µl of 20 mg/ml proteinase K and incubated at 55°C overnight with shaking at 200 rpm using a GFL 3005 orbital shaker (GFL mbH, Burgwedel, Germany) inside of a TPP 500 incubator (Memmert GmbH, Schwabach, Germany). Then, the samples were left to cool at room temperature. Five hundred microliters of chloroform (Sigma) was added to the lysate before centrifugation at  $16,500 \times g$  for 10 min. Genomic DNA from the clear aqueous supernatant obtained after the centrifugation (500 µl) was purified with the Wizard DNA Clean-Up Kit, with a vacuum manifold, according to the manufacturer's instructions. The DNA was eluted in 100 µl of sterile deionized water.

**Sample preparation for sensitivity assays.** Five hundred grams of fresh tomatoes were scalded in boiling water, aseptically peeled, and the tomato pulp homogenized in a presterilized blender. To assess the absence of fungal contamination, the tomato pulp samples were plated in Sabouraud-CAF and incubated at 25°C for 48 h. Moreover, 1-ml aliquots of tomato pulp were tested in triplicate by PCR by using the *Alternaria*-specific primers Dir1ITSAlt-Inv1ITSAlt and under the amplification conditions described below. Samples that tested negative for *Alternaria* spp. by culture techniques and PCR methods were used for the inoculation experiment.

Samples of tomato pulp (0.9 ml) were inoculated with 0.1 ml of different *Alternaria* culture dilutions ( $10^6$  to  $10^8$  CFU/ml). One milliliter of noninoculated aliquot was included as a negative control.

DNA extraction from 1-ml samples of tomato pulp inoculated with *Alternaria* culture dilutions was carried out as described for *Alternaria* cultures. Moreover, tomato pulp samples and the culture dilutions used for inoculation were serially diluted in PBS and plated on Sabouraud-CAF. Molds were enumerated after incubation at 25°C for 1 to 2 days.

**Primer design.** The forward primer Dir1ITSAlt (5'-TGT CTT TTG CGT ACT TCT TGT TTC CT-3') and the reverse

primer Inv1ITSAlt (5'-CGA CTT GTG CTG CGC TC-3') were designed with the aid of the EMBOSS software package, version 2.2.0, and Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA), based on alignment and comparison of rDNA sequences available in the GenBank-European Molecular Biology Laboratory (EMBL) database. The sequences used for the design included several *Alternaria* and other fungal species like *A. alternata* (accession no. EF192234), *A. arborescens* (DQ242506), *A. citri* (EF104220), *A. dauci* (AF267130), *A. gaisen* (DQ778960), *A. infectoria* (AJ549824), *A. longipes* (AY751457), *A. porri* (DQ323700), *A. radicina* (DQ394074), *A. solani* (AY154716), *A. tenuissima* (EF364096), *Aspergillus ochraceus* (DQ336712), *Fusarium oxysporum* (EF155534), *Penicillium expansum* (DQ339562), *Rhizopus stolonifer* (DQ767605), and *Debaryomyces hansenii* (EF197950), together with sequences from rice (DQ923413) and cattle (DQ222453). Primers Dir1ITSAlt and Inv1ITSAlt hybridize, respectively, on the ITS1 and ITS2 regions of *Alternaria* spp. and delimit a DNA fragment of approximately 370 bp in *Alternaria* spp.

The forward primer 18SFWEU (5'-AGG ATC CAT TGG AGG GCA AGT-3') and the reverse primer 18SRVEU (5'-TCC AAC TAC GAG CTT TTT AAC TGC A-3') were used as positive amplification controls of the assay. These primers delimit a conserved region of 99 bp of the 18S rRNA gene in all the eukaryotic species.

**PCR amplification.** PCR amplification reactions were done in a total volume of 25 µl. Each reaction mixture contained 10 ng of template DNA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate, 10 pmol of Dir1ITSAlt and Inv1ITSAlt primers, and 1 unit of *Tth* DNA polymerase (Biotoools, Madrid, Spain) in a reaction buffer supplied with the enzyme. PCR amplification was done in a Progene thermal cycler (Techne, Ltd., Cambridge, UK) under the following conditions: an initial denaturation at 94°C for 1 min, followed by 35 amplification cycles consisting of 94°C for 30 s for DNA denaturation, 55°C for 30 s for primers annealing, and 72°C for 45 s for DNA extension. A final extension step at 72°C for 5 min also was included. Positive control amplifications were set with 5 pmol of 18SFWEU-18SRVEU primers combined in duplex PCR with specific primer pairs.

PCR products (10 µl) were mixed with 2 µl of gel loading solution (Sigma), and analyzed by electrophoresis in 2% low electroendosmosis D1 agarose gel or 3.5% MS8 agarose gel (Hispanlab S.A., Torrejón, Spain) containing 1 µg/ml ethidium bromide in TAE buffer for 30 min at 110 V, and the gel was visualized by UV transillumination by using the Chemidoc XRS System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

**Sequencing of PCR products and sequence analysis.** ITS amplicons (370 bp), of the expected length obtained with oligonucleotides Dir1ITSAlt and Inv1ITSAlt were loaded onto a 2% LM2 (Hispanlab S.A.) agarose gel containing 1 µg/ml ethidium bromide in TAE buffer, and electrophoresed at 90 V for 70 min. Each DNA fragment was excised from the agarose gel under UV light by using a sterile scalpel. The gel slice was purified with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. The concentration of the PCR products was estimated by agarose gel electrophoresis by using a standard as reference marker (REAL, Durviz S.L., Valencia, Spain). A Chemidoc XRS System (Bio-Rad) was used for that purpose. Purified PCR products were sequenced in both directions at Sistemas Genómicos S.L. (Parque Tecnológico de Valencia, Spain). DNA sequencing was accomplished in an ABI Prism model 377 DNA sequencer (Applied



Biosystems) by using Dir1ITSAlt and Inv1ITSAlt primers with the dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). The sequences obtained were submitted to GenBank-EMBL database, and the assigned accession numbers are included in Table 1. The resulting DNA sequences were searched for homology to those available at the GenBank-EMBL database by using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program (20). Phylogenetic analyses were done with the software MEGA, version 4 (34). Confidence in the branching points was obtained by conducting 1,000 bootstrap replicates by using maximum parsimony as the criterion (11). The most parsimonious tree was obtained with the close-neighbor-interchange algorithm (21) with search level 7, in which the initial trees were obtained with the random addition of sequences (10 replicates). All positions containing gaps and missing data were eliminated from the data set ("Complete deletion" option).

**Detection limit of the PCR.** Sensitivity assays were carried out with *Alternaria* spp. culture dilutions (either viable or heat treated as described above), and also by using experimentally inoculated tomato pulp. Tomato pulp samples (0.9 ml) were inoculated with 0.1 ml of approximately  $10^6$  to  $10^{-1}$  CFU/ml (determined by plate count in CAF-Sabouraud). After DNA isolation from the *Alternaria* dilutions and inoculated tomato samples, the PCR reactions were carried out in triplicate in three independent experiments.

**Analysis of commercial food products.** Eleven raw tomato samples, 37 tomato products (6 sun-dried tomatoes, 2 tomato pastes, 8 canned tomatoes, 7 ketchups, 12 tomato sauces, and 2 ratatouille samples), and 11 cereal-based infant food samples were purchased from several local supermarkets and retail shops. Samples were homogenized in a stomacher, and the DNA extraction was carried out with the Wizard DNA Clean-Up System. A positive control (*Alternaria* culture) and a negative control (sterile deionized water) were processed along with the samples to confirm both that DNA extraction had been successful, and the lack of contamination of reagents. PCR reactions were performed in triplicate in three independent experiments. Mold counts were determined by plating in Sabouraud-CAF. The 370-bp amplicons obtained from the positive samples were gel purified and sequenced. The sequences obtained were compared with the GenBank database and a dendrogram was constructed including sequences from the database.

## RESULTS

**Assay development and specificity.** Alignment of rDNA sequences of fungi, plants, and animals available in the GenBank-EMBL database was performed with the EMBOSS software package. This information was used to design primers Dir1ITSAlt and Inv1ITSAlt, which hybridize on the internal transcribed spacer regions ITS1 and ITS2 of *Alternaria* spp., and should amplify a DNA fragment of approximately 370 bp in all the *Alternaria* spp.

Specificity of the primer pair Dir1ITSAlt-Inv1ITSAlt was tested by PCR analysis of DNA obtained from 11 *Alternaria* spp. and also from other nontarget species. All *Alternaria* strains yielded one approximately 370-bp fragment after PCR amplification with the Dir1ITSAlt-Inv1ITSAlt primer pair (Fig. 1A). No cross-species amplification was obtained from other fungal, bacterial, animal, or plant species analyzed (Fig. 1B).

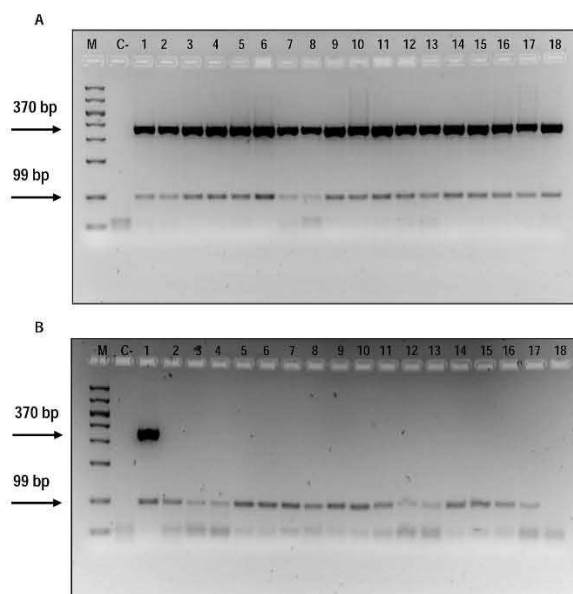


FIGURE 1. Electrophoretic analysis of ITS PCR products obtained with *Alternaria*-specific primers Dir1ITSAlt-Inv1ITSAlt combined with 18SFWEU-18SRVEU positive amplification control primers. (A) Samples in lanes correspond to the following *Alternaria* species: 1, *A. alternata* CBS 117143; 2, *A. gaisen* CBS 632.93; 3, *A. dauci* CBS 101592; 4, *A. longipes* CBS 917.96; 5, *A. citri* CBS 192.81; 6, *A. radicina* CBS 245.67; 7, *A. porri* CBS 109.41; 8, *A. solani* CBS 347.79; 9, *A. arborescens* CBS 109730; 10, *A. arborescens* MAP05; 11, *A. tenuissima* CBS 880.95; 12, *A. tenuissima* MAP01; 13, *A. tenuissima* MAP02; 14, *A. tenuissima* MAP06; 15, *A. infectoria* CBS 210.86; 16, *A. infectoria* MAP03; 17, *A. infectoria* MAP04; 18, *A. infectoria* MAP08. (B) Samples included 1, *A. alternata* CBS 117143; 2, *Rhizopus stolonifer*; 3, *Penicillium expansum*; 4, *Fusarium oxysporum*; 5, *Aspergillus alutaceus*; 6, *Saccharomyces cerevisiae*; 7, *peanut*; 8, *oats*; 9, *soy*; 10, *tomato*; 11, *barley*; 12, *almond*; 13, *pistachio*; 14, *hazelnut*; 15, *goat*; 16, *hake*; 17, *chicken*; and 18, *Escherichia coli*. C-, negative control; M, molecular weight (1 kb plus DNA ladder; Invitrogen, Carlsbad, CA).

To avoid false-negative results, a positive amplification control was done for all samples analyzed in each PCR experiment by using 18SFWEU and 18SRVEU primers. These primers successfully amplified a conserved 99-bp fragment on the 18S rRNA gene of all the eukaryotic species analyzed (Fig. 1A and 1B).

**rDNA sequence analysis.** The ITS sequences obtained from the 23 *Alternaria* strains used in this study were compared with rDNA sequences available in the GenBank database by using the BLAST program. Identity (100%) was found for each strain with sequences belonging to the same *Alternaria* spp. Phylogenetic analysis with MEGA 4.0 generated 11,616 most parsimonious trees from 319 positions of aligned DNA sequences, of which 23 were parsimony informative. The bootstrap consensus tree inferred from 1,000 replicates consisted of four different clades (Fig. 2). Clade I was composed of all strains belonging to *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. gaisen*, *A. citri*,

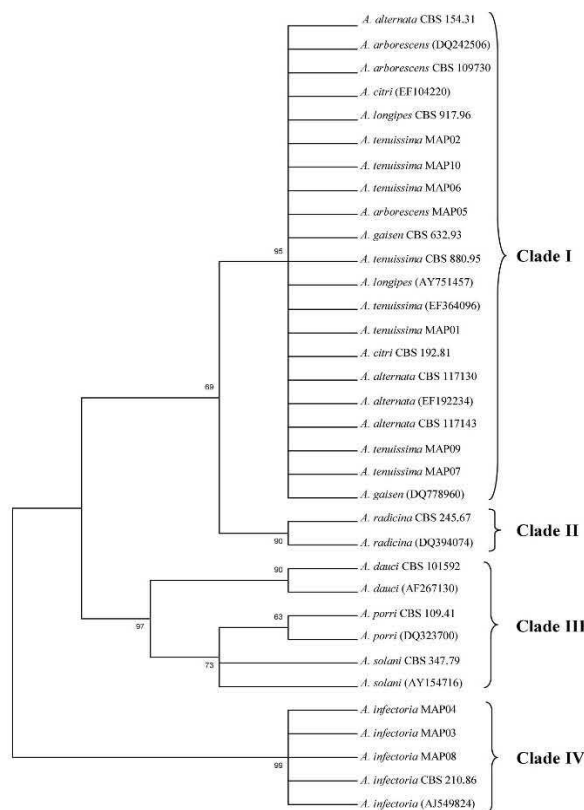


FIGURE 2. Maximum-parsimony consensus tree, based on sequences of the ITS regions of *Alternaria* spp. Bootstrap values based on 1,000 replications are indicated as percentages next to the branches when replication frequencies exceed 50%. Codes between brackets refer to sequences from GenBank.

*A. longipes*, and *A. arborescens*. The bootstrap of this clade indicated 95% unity. Clade II, with a bootstrap value of 90%, consisted of *A. radicina* strains. Clade III, with 97% bootstrap support, was formed by *A. porri*, *A. solani*, and *A. dauci*. Finally, all *A. infectoria* strains clustered together in clade IV, with a bootstrap value of 99%.

**Detection limit of PCR.** Sensitivity assays were carried out with *Alternaria* spp. culture dilutions (either viable or heat treated as described above), and also by using experimentally inoculated tomato pulp. In the PCR, it was observed that the lower the *Alternaria* counts, the fainter the *Alternaria*-specific band obtained. The sensitivity of the assay (minimum concentration of *Alternaria* spp. producing visible DNA amplification) was of approximately  $10^2$  CFU/ml (Fig. 3). Using a viable *A. alternata* culture as a template, a visible band was obtained for counts of  $6 \times 10^2$  CFU/ml (Fig. 3A, lane 3), while amplification was also obtained from tomato pulp experimentally inoculated with  $1 \times 10^2$  CFU/ml (Fig. 3A, lane 8). The detection limit of *A. alternata* after heat inactivation of the culture at  $90^\circ\text{C}$  for 5 min was  $6 \times 10^2$  CFU/ml (Fig. 3B, lane 5), although a very faint band was obtained with 60 CFU/ml, and the sensitivity was  $1 \times 10^2$  CFU/ml for inoculated tomato pulp

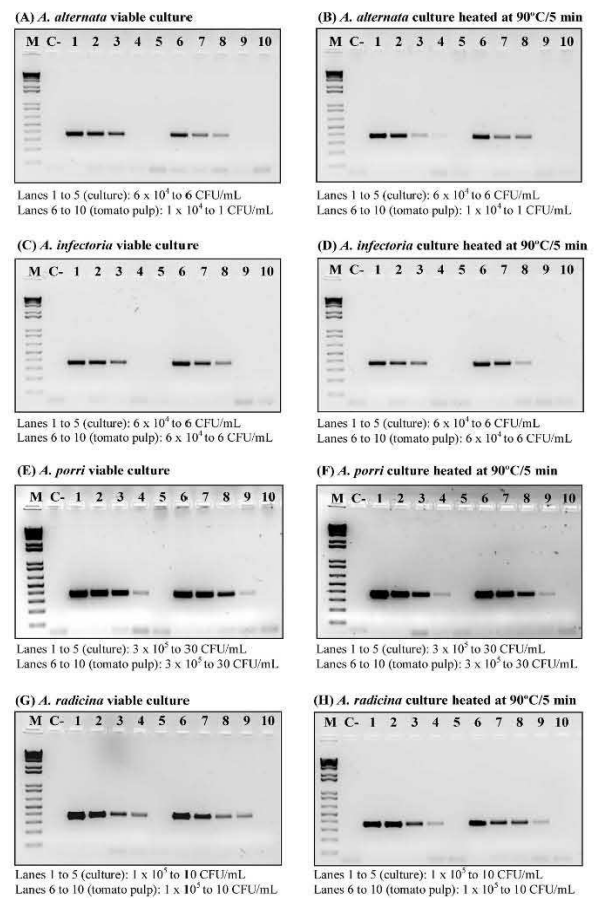


FIGURE 3. Electrophoretic analysis of ITS PCR products obtained with the *Alternaria*-specific primers *Dir1ITSAlt-Inv1ITSAlt* from decimal dilutions of *A. alternata*, *A. infectoria*, *A. porri*, and *A. radicina* cultures (lanes 1 to 5) and from tomato pulp inoculated with those cultures (lanes 6 to 10). Mold counts for each set of samples have been included as a footnote in each gel image. (A) *A. alternata* viable culture, and tomato pulp inoculated with viable culture. (B) *A. alternata* culture heated at  $90^\circ\text{C}$  for 5 min, and tomato pulp inoculated with heat-inactivated culture. (C) *A. infectoria* viable culture, and tomato pulp inoculated with viable culture. (D) *A. infectoria* culture heated at  $90^\circ\text{C}$  for 5 min, and tomato pulp inoculated with heat-inactivated culture. (E) *A. porri* viable culture, and tomato pulp inoculated with viable culture. (F) *A. porri* culture heated at  $90^\circ\text{C}$  for 5 min, and tomato pulp inoculated with heat-inactivated culture. (G) *A. radicina* viable culture, and tomato pulp inoculated with viable culture. (H) *A. radicina* culture heated at  $90^\circ\text{C}$  for 5 min, and tomato pulp inoculated with heat-inactivated culture. C-, negative control; M, molecular weight (1 kb plus DNA ladder).

(Fig. 3A, lane 8). Similar results were obtained for amplification of DNA from *A. infectoria*, *A. porri*, and *A. radicina* viable cultures, and from tomato pulp inoculated with those cultures. The last visible amplicon was obtained with  $6 \times 10^2$  CFU/ml for *A. infectoria* (Fig. 3C, lanes 3 and 8),  $3 \times 10^2$  CFU/ml for *A. porri* (Fig. 3E, lanes 4 and 9), and  $1 \times 10^2$  CFU/ml for *A. radicina* (Fig. 3G, lanes 4 and 9). The detection limit was not modified after heat

TABLE 2. Results of PCR detection of *Alternaria* in food products by using specific primers developed in this study<sup>a</sup>

Type of product	Samples (n)	Amplification product with <i>Alternaria</i> spp. primers Dir1ITSAlt-Inv1ITSAlt (bp)
Cereal-based infant food	4	374
Cereal-based infant food	7	— <sup>b</sup>
Unspoiled tomato (fresh fruit)	8	—
Spoiled tomato (fresh fruit)	3	371
Sun-dried tomato (dry packed)	2	371
Sun-dried tomato (in oil)	4	—
Tomato paste	2	—
Canned tomato	8	—
Ketchup	7	—
Tomato sauce	11	—
Tomato sauce	1	371
Ratatouille	2	—

<sup>a</sup> A 99-bp amplicon was obtained in all the samples, using positive amplification control primers 18SFWEU–18SRVEU.

<sup>b</sup> —, no amplification of the corresponding fragment.

inactivation of the *A. infectoria* (Fig. 3D), *A. porri* (Fig. 3F), and *A. radicina* (Fig. 3H) cultures at 90°C for 5 min. Heat treatment of the *Alternaria* spp. cultures at 60°C for 30 min also produced similar amplification profiles (results not shown).

**Analysis of commercial food products.** The PCR assay revealed the presence of *Alternaria* spp. DNA in 10 of 59 samples analyzed (Table 2). Eleven tomato fruit samples were analyzed, 3 of which were spoiled fruits and 8 unspoiled tomatoes. All unspoiled tomatoes tested negative in the *Alternaria* PCR assay, while the 3 spoiled ones tested positive. Three (8%) of 37 processed tomato products and 4 (36.4%) of 11 cereal-based infant food samples were positive in the analysis of *Alternaria* spp. by PCR. The 18SFWEU and 18SRVEU primers successfully amplified a conserved 99-bp fragment on the 18S rRNA gene of all samples analyzed, confirming that the samples where *Alternaria* DNA was not detected did not correspond to false-negative results.

Mold counts of approximately 10<sup>3</sup> CFU/g were obtained in Sabouraud-CAF from all spoiled tomato fruits analyzed, while 10<sup>2</sup> CFU/g was isolated from the two sun-dried tomato samples packaged in a cardboard tray wrapped in plastic film. The mold plate counts of peeled, unspoiled, fresh tomato fruits were negative. In addition, no viable molds were isolated from the remaining processed tomato products analyzed. All of them were hermetically sealed, heat-treated products, packaged either in cans or in glass jars.

The amplicons obtained with *Alternaria* spp.-specific primers from commercial foodstuff samples were purified and sequenced in both directions, and the consensus sequences obtained were compared with rDNA sequences from the GenBank-EMBL database by using the BLAST program. The sequences obtained from positive samples

were included in the phylogenetic analysis together with the *Alternaria* spp. sequences used in Figure 2. Sequences obtained from tomato samples and tomato products clustered together in the *A. alternata* clade. The bootstrap value for this clade indicated 93% unity. The sequences obtained from cereal-based infant food samples clustered in the *A. infectoria* clade with bootstrap value indicating 99% unity.

## DISCUSSION

*Alternaria* mycotoxins have been frequently isolated from raw and processed fruits, vegetables, and oilseeds infected by *Alternaria* rot. Because of the high number and chemical diversity of the mycotoxins produced by *Alternaria* spp., the detection of all of them in food products or raw materials would not be practical or affordable. However, detection and enumeration of viable and nonviable *Alternaria* spp. in processed fruits and vegetables (juices, sauces, preserves) would be determinant to assess the quality of the raw materials used, and would indicate a toxigenic risk of the final products.

Conventional methods for mold identification and enumeration are cumbersome and time-consuming. In contrast, genetic methods are quick and sensitive alternative approaches for the detection of food spoilage and pathogenic microorganisms. A key requirement for successfully detecting specific microorganisms with a PCR assay is to choose adequate genetic markers during the primer design process that allow a high degree of specificity (30). The ribosomal gene sequences, particularly the internal transcribed spacer regions ITS1 and ITS2, have been used to study the phylogeny of *Alternaria* species (8, 14, 31, 35). Thus, the ITS was the target of choice for primer design in this study, aimed to develop a PCR-based assay for detection of *Alternaria* spp. in food products.

The PCR assay developed uses *Alternaria* spp.-specific primers (Dir1ITSAlt and Inv1ITSAlt) targeting the highly variable ITS1 and ITS2 rDNA regions. These primers specifically amplified *Alternaria* spp. DNA and showed no cross-reactivity to other fungal, plant, or animal species.

Sequence analysis of the PCR products of the expected length obtained from *Alternaria* isolates was done to assess the specificity of the PCR assay. All the sequences showed a 100% homology with *Alternaria* spp. rDNA after a BLAST search in the GenBank-EMBL database. The phylogenetic analysis of rDNA variations showed that *Alternaria* spp. cluster together in monophyletic groups, corresponding to the morphology and size of the conidia, as also reported by others (13, 14, 29). In Clade I clustered together the sequences corresponding to sporulation groups 1 to 5 of small-spored *Alternaria* spp. like *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. gaisen*, *A. citri*, *A. longipes*, and *A. arborescens* (32). These species are important for food safety, because they produce mycotoxins like AOH, AME, and TeA (3, 4) that can withstand food processing. They are also responsible for extensive deterioration of plants and plant products, leading to considerable economic losses to growers and the food processing industry. Moreover,

toxigenic *A. alternata* strains and the mycotoxins tenuazonic acid and alternariols have been commonly found in black mold of tomato, black rot of olive and citrus, black point of small cereals, and black mold of several vegetables like sunflower, oilseed rape, pepper, or melon (16, 28). Clade II includes only *A. radicina*, characterized for having large, dark-colored conidia that lack prominent beaks and are produced simply or in chains of two (or rarely three) conidia (32). Species of this group are important umbelliferous pathogens, producing diseases like the carrot black rot (29). Clade III corresponds to *A. porri* sp. group, with large, long beaked, non-catenated conidia. Species in this clade include *A. porri*, *A. solani*, and *A. dauci*, which are responsible of foliar blights of carrots, onions, potatoes, and tomatoes (1). Finally, Clade IV includes all the sequences from *A. infectoria*, which is the only *Alternaria* sp. known to have a sexual stage (*Lewia infectoria*). *A. infectoria* sp. group affects cereals crops in the field and during storage. None of the organisms—members in the *A. infectoria* sp. group produce alternariols or tenuazonic acid, which are common in other small-spored *Alternaria* species (4), or altersolanols, common in some large-spored *Alternaria* (1). On the other hand, taxa in this species group produce metabolites like infectopyrones and novae-zelandins that are not found in other *Alternaria* spp. groups (5, 9).

The sensitivity of the PCR method developed for detection of *Alternaria* spp. was assessed by analysis of DNA obtained from culture dilutions and from experimentally inoculated tomato samples. The PCR results obtained showed a detection limit of approximately  $10^2$  CFU/ml for *A. alternata*, *A. porri*, *A. dauci*, and *A. infectoria*, either in culture or inoculated tomato pulp.

Heat inactivation of *Alternaria* cultures at 60°C for 30 min or 90°C for 5 min did not modify the detection limit of the PCR assay developed in this work. Detection of *Alternaria* DNA in cultures subjected to heat treatments and in heat-treated food products has not been previously reported. However, it has a great interest, because processed foods like juices, ketchup, sauces, etc., are subjected to heat treatments, and detection of *Alternaria* DNA reveals the use of damaged raw materials in the manufacture of these processed foods, even though mold counts may be negative.

The analysis of commercial samples demonstrated the presence of *Alternaria* spp. DNA in 10 (17%) of the 59 samples analyzed. Sequence analysis of the PCR products obtained from *Alternaria*-positive samples demonstrated that DNA from the *A. alternata* sp. group was present in 12.5% of tomato samples and tomato products analyzed. DNA from *A. infectoria* species group was detected in 36.4% of cereal-based infant food samples analyzed. Our results are in agreement with previously reported assays, in which *Alternaria* is a fungal genus frequently isolated from tomatoes. Moreover, the presence of *A. alternata*, *A. tenuissima*, and *A. arborescens* has been associated with serious postharvest damage of tomatoes (2, 36), while *A. infectoria* is the most prevalent *Alternaria* sp. in cereals (5, 10, 24, 26, 32). It should be pointed out that the two samples of dried tomato analyzed in the present survey that tested positive for *Alternaria* DNA had been manufactured with

traditional sun-drying methods, and were packaged in a cardboard tray wrapped in a plastic film. Mold counts detected in these samples were 100 CFU/g, showing that traditional methods for drying tomatoes might offer optimal environmental conditions for mold growth and mycotoxin production.

A common problem of PCR-based methods for food analysis is failure of DNA amplification due to the presence of inhibitory substances in the samples or to DNA shearing. Thus, it is essential to include positive controls in order to avoid false-negative results. The absence of the control product would indicate a technical problem in the process and would avoid false-negative findings (39). For this reason, a positive amplification control was performed in each PCR experiment by using 18SFWEU and 18SRVEU primers. These primers successfully amplified a conserved 99-bp fragment on the 18S rRNA gene of all eukaryotic species, and also all the food samples analyzed. These results confirm that the food samples appearing negative in the *Alternaria*-specific PCR assay did not correspond to false-negative results.

Control of mycotoxin contamination of foods should be based on risk assessment thorough the food chain. In the food industry, postharvest control of mycotoxins has been addressed via hazard analysis and critical control point plans (19), which include use of approved supplier schemes. Implementation at preharvest stages of the food systems needs more attention, and would provide a critical front-line defense to prevent introduction of contaminants into the food and feed supplies.

Application of preventive control strategies for *Alternaria* mycotoxins from farm to fork requires the development of rapid, sensitive, and specific analytical methods that could be applied at any stage of the food chain. The PCR assay developed in this work is specific and sensitive for detection of *Alternaria* DNA in raw materials and processed food products. Moreover, results are obtained in less than 48 h, as compared with several days or weeks required by conventional methods for *Alternaria* detection and identification. Rapid *Alternaria* DNA detection is very advantageous, because *Alternaria* mycotoxins are usually very stable during food processing. A positive PCR result can therefore be taken as an indication of the use of low-quality raw materials, and the potential presence of *Alternaria* mycotoxins in the final products that should be analyzed further. Accordingly, this assay could be useful as a screening method for detection and identification of *Alternaria* spp., and could be applied as a quality and biosecurity marker of raw materials and final products in the fruits, vegetables, and cereals processing industries.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grant no. AGL 2006-07659 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the "Programa de Vigilancia Sanitaria" 2009/AGR-1489 from the Comunidad de Madrid (Spain). M. Pavón, M. Rojas, and N. Pegels are recipients of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). The authors thank Dr. Birgitte Andersen (Systems Biology, Technical University of Denmark, Lyngby, Copenhagen) for her help with the morphological identification of *Alternaria* cultures.



## REFERENCES

- Andersen, B., A. Dongo, and B. M. Pryor. 2008. Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. tomatophila*. *Mycol. Res.* 112:241–250.
- Andersen, B., and J. Frisvad. 2004. Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* 52:7507–7513.
- Andersen, B., E. Kroger, and R. G. Roberts. 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen*, and *A. longipes*. *Mycol. Res.* 105:291–299.
- Andersen, B., E. Kroger, and R. G. Roberts. 2002. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria*, and *A. tenuissima* species groups. *Mycol. Res.* 106:170–182.
- Andersen, B., J. L. Sorensen, K. F. Nielsen, B. G. van den Ende, and S. de Hoog. 2009. A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectoria* species group. *Fungal Genet. Biol.* 46:642–656.
- Azcarate, M. P., A. Patriarca, L. Terminello, and P. Fernandez. 2008. *Alternaria* toxins in wheat during the 2004 to 2005 Argentinean harvest. *J. Food Prot.* 71:1262–1265.
- Bottalico, A., and A. Logrieco. 1998. Toxigenic *Alternaria* species of economic importance, p. 65–108. In K. K. Sinha and D. Bhatnager (ed.), *Mycotoxins in agriculture and food safety*. Marcel Dekker, New York.
- Chou, H., and W. Wu. 2002. Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. *Mycol. Res.* 106:164–169.
- Christensen, K. B., J. W. van Klink, R. T. Weavers, T. O. Larsen, B. Andersen, and R. K. Phipps. 2005. Novel chemotaxonomic markers for the *Alternaria infectoria* species group. *J. Agric. Food Chem.* 53:431–435.
- Dugan, F. M., and T. L. Peever. 2002. Morphological and cultural differentiation of described species of *Alternaria* from *Poaceae*. *Mycotaxon* 83:229–264.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.
- Iniesta, M. D., D. Pérez-Conesa, J. García-Alonso, G. Ros, and M. J. Periago. 2009. Folate content in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Influence of cultivar, ripeness, year of harvest, and pasteurization and storage temperatures. *J. Agric. Food Chem.* 57:4739–4745.
- Konstantinova, P., P. Bonants, M. van Gent-Pelzer, P. van der Zouwen, and R. van den Bula. 2002. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. *Mycol. Res.* 106:23–33.
- Kusaba, M., and T. Tsuge. 1995. Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Curr. Genet.* 28:491–498.
- Liu, G. T., Y. Z. Qian, P. Zhang, Z. M. Dong, Y. M. Qi, and H. T. Guo. 1992. Etiological role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer. *Chin. Med. J.* 105:390–400.
- Logrieco, A., A. Bottalico, M. Mulé, A. Moretti, and G. Perrone. 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *Eur. J. Plant Pathol.* 109:645–667.
- Marek, P., T. Annamalai, and K. Venkitanarayan. 2003. Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction. *Int. J. Food Microbiol.* 89:139–144.
- Motta, S., and L. M. Valente Soares. 2000. Simultaneous determination of tenuazonic and cyclopiazonic acids in tomato products. *Food Chem.* 71:111–116.
- Murphy, P. A., S. Hendrich, C. Landgren, and C. M. Bryant. 2006. Food mycotoxins: an update. *J. Food Sci.* 71:51–65.
- National Center for Biotechnology Information. 2009. Basic Local Alignment Search Tool. Available at: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Accessed 1 March 2010.
- Nei, M., and S. Kumar. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York.
- Niessen, L. 2007. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 119:38–46.
- Ostry, V. 2008. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin J.* 1:175–188.
- Peever, T. L., G. Su, L. Carpenter-Boggs, and L. W. Timmer. 2004. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. *Mycologia* 96:119–134.
- Perelló, A. E., M. Moreno, and M. N. Sisterna. 2008. *Alternaria infectoria* species group associated with black point of wheat in Argentina. *Plant Pathol.* 57:379.
- Pozzi, A. E., and M. N. Sisterna. 2006. Leaf blight of wheat caused by *Alternaria trititica* in Argentina. *Plant Pathol.* 55:303.
- Pitt, J. I., and A. D. Hocking. 1997. Fungi and food spoilage. Blackie Academic and Professional, London.
- Pozzi, C. R., R. Braghini, J. Arcaro, P. Zorzete, A. L. Israel, I. O. Pozar, S. Denucci, and B. Correa. 2005. Mycoflora and occurrence of alternariol and alternariol monomethyl ether in Brazilian sunflower from sowing to harvest. *J. Agric. Food Chem.* 53:5824–5828.
- Pryor, B., and R. L. Gilbertson. 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mtSSU rDNA sequences. *Mycol. Res.* 104:1312–1321.
- Scheu, P., M. K. Berghof, and U. Stahl. 1998. Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction. *Food Microbiol.* 15:13–31.
- Seung-Jo, G., H. Seung-Beum, K. Hee-Wan, Y. Seung-Hun, and R. Jin-Chang. 1997. Phylogenetic relationship of host-specific toxin-producing *Alternaria* spp. on the basis sequences of internal transcribed spacer in ribosomal DNA. *Crop Prot.* 39:1–9.
- Simmons, E. G. 2007. *Alternaria*, an identification manual. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands.
- Solfrizzo, M., A. De Girolamo, C. Vitti, K. Tytkowska, J. Grabarkiewicz-Szczesna, D. Szopinska, and H. Dorna. 2005. Toxigenic profile of *Alternaria alternata* and *Alternaria radicina* occurring on umbelliferous plants. *Food Addit. Contam.* 22:302–308.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596–1599.
- Vujanovic, V., and M. Labrecque. 2008. Potentially pathogenic and biocontrol *Ascomycota* associated with green wall structures of basket willow (*Salix viminalis* L.) revealed by phenotypic characters and ITS phylogeny. *Biocontrol* 53:413–426.
- Xu, L., and L. Du. 2006. Direct detection and quantification of *Alternaria alternata* *lycopersici* toxins using high-performance liquid chromatography–evaporative light-scattering detection. *J. Microbiol. Methods* 64:398–405.
- Zhou, G., W. Z. Whong, T. Ong, and B. Chen. 2000. Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment. *Mol. Cell. Probes* 14:339–348.
- Zur, G., E. M. Hallerman, R. Sharf, and Y. Kashi. 1999. Development of a polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Alternaria* fungal contamination in food products. *J. Food Prot.* 62:1191–1197.
- Zur, G., E. M. Shimoni, E. Hallerman, and Y. Kashi. 2002. Detection of *Alternaria* fungal contamination in cereal grains by a polymerase chain reaction-based assay. *J. Food Prot.* 65:1433–1440.

### III.2. CORRELATION BETWEEN THE DETECTION OF *ALTERNARIA* SPP. BY PCR AND THE PRESENCE OF THEIR MYCOTOXINS IN TOMATO PRODUCTS

- PCR-based assay for the detection of *Alternaria* species and correlation with HPLC determination of alternuene, alternariol and alternariol monomethyl ether production in tomato products



***Food Control***

*Volume 25, pages 45-52, 2012*







Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Food Control

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)

## PCR-based assay for the detection of *Alternaria* species and correlation with HPLC determination of alternuene, alternariol and alternariol monomethyl ether production in tomato products

Miguel Ángel Pavón<sup>a</sup>, Agustín Luna<sup>b</sup>, Silvia de la Cruz<sup>a</sup>, Isabel González<sup>a</sup>, Rosario Martín<sup>a</sup>, Teresa García<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, 5016 Córdoba, Argentina

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 20 June 2011

Received in revised form

26 September 2011

Accepted 4 October 2011

## Keywords:

*Alternaria* spp.

PCR

Mycotoxin

HPLC

Tomato products

## ABSTRACT

*Alternaria* spp. contamination and subsequent production of mycotoxins is a common problem in vegetable crops. Identification of *Alternaria* species by traditional methods requires specific skills and may not detect toxigenic moulds inactivated by food processing. By using molecular methods such as PCR the detection of *Alternaria* spp. becomes possible directly from the food or feed samples. In this study, a PCR method based on the Internal Transcribed Spacer (ITS) genetic marker has been used for detection of *Alternaria* spp. in raw and processed commercial tomato samples. Occurrence of alternuene, alternariol and alternariol methyl ether in the samples was analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC) in order to assess the ability of the PCR assay to identify tomato samples containing *Alternaria* mycotoxins. The PCR assay revealed the presence of *Alternaria* spp. DNA in 41 out of 90 commercial samples (45.6%), while HPLC detected at least one of the *Alternaria* mycotoxins within 31 of the PCR positive samples. Detection of *Alternaria* DNA correlated well with the presence of the analysed *Alternaria* mycotoxins, indicating that the PCR protocol developed in this work for detection of *Alternaria* spp. DNA could be used as an indirect marker of the presence of *Alternaria* mycotoxins in raw and processed tomato products.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Alternaria* is a ubiquitous fungal genus and includes saprophytic, endophytic and pathogenic species. The cosmopolitan nature of small-spored *Alternaria* species makes them important in a broad range of disciplines. As saprophytic, they can spoil food products and animal feedstuffs by deterioration and by production of biological active compounds. As plant pathogens, they can cause serious problems in agriculture by reducing crop yield in the field and causing considerable economic losses to growers and food processing industry (Bottalico & Logrieco, 1998; Logrieco, Bottalico, Mulé, Moretti, & Perrone, 2003; Ostry, 2008; Pitt & Hocking, 1997). *Alternaria* spp. can produce a wide variety of toxic metabolites belonging to three different structural groups: the dibenzopyrone derivatives, alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME), and alternuene (ALT); the perylene derivatives altertoxins (ATX-I and II); and the tetramic acid derivative, tenuazonic acid (TeA), being TeA, dibenzopyrone derivatives and ATX-I the main *Alternaria*

mycotoxins that can be found as contaminants of food commodities (Pose, Patriarca, Kyanko, Pardo, & Fernández, 2010).

Exposure to *Alternaria* toxins has been linked to a variety of adverse health effects. AME and AOH are mutagenic, carcinogenic, genotoxic and cytotoxic in microbial and mammalian cell systems (An et al., 1989; Lehmann, Wagner, & Metzler, 2006; Liu et al., 1992; Scott & Stolz, 1980). No comprehensive cancer studies of these *Alternaria* mycotoxins in animals have been carried out; however, precancerous changes were observed in oesophageal mucosa of mice fed 50–100 mg kg<sup>-1</sup> body weight (b.w.) per day of AME for 10 months (Ostry, 2008; Yekeler, Bitmis, Özcelik, Doymaz, & Calta, 2001). The toxicity of ALT was determined by Panigrahi and Dallin (1994) in brine shrimp larvae. The 50% lethal concentration dose of ALT was 375 g mL<sup>-1</sup> while the doses for TeA and AOH were 75 and 200 mg mL<sup>-1</sup>, respectively.

*Alternaria* mycotoxins have been frequently isolated from raw and processed fruits, vegetables, and oilseeds infected by *Alternaria* rot such as tomato products (Bottalico & Logrieco, 1998; Fente, Jaimez, Vázquez, Franco, & Cepeda, 1998; da Motta & Valente Soares, 2001; Ostry, 2008; Patriarca, Azcarate, Terminiello, & Fernández, 2007; Terminiello, Patriarca, Pose, & Fernández, 2006),

\* Corresponding author. Tel.: +34 913943747; fax: +34 913943743.  
E-mail address: [tgarcia@vet.ucm.es](mailto:tgarcia@vet.ucm.es) (T. García).



olives (Visconti, Logrieco, & Bottalico, 1986), citrus fruits (Magnani, De Souza, & Rodrigues-Filho, 2007), cereals (Azcarate, Patriarca, Terminiello, & Fernández, 2008; Mansfield, Archibald, Jones, & Kulda, 2007; Medina et al., 2006), apples and apple juice (Delgado & Gómez-Cordovés, 1998; Jackson & Al-Tajer, 2008), carrots (Solfrizzo, de Girolamo, Vitti, Visconti, & van den Bulk, 2004), pepper, melon (Bottalico & Logrieco, 1998), sunflower (Pozzi et al., 2005) and oilseed rape (Visconti, Sibilia, & Sabia, 1992).

Tomato products are widely consumed in Spain, where the consumption of raw and processed tomato were almost 20 kg per capita in 2009 (MARM, 2009). Tomato constitutes the horticultural product with the highest plant processing volume in the country and it is the most extended vegetable crop with approximately 100,000 ha (MARM, 2010). Because of their thin skin, tomatoes are very susceptible to fungal decay, and *Alternaria* is the most common fungus on mouldy tomatoes (Barkai-Golan & Paster, 2008; Terminiello et al., 2006). Direct consumption of mouldy tomatoes by the consumer is not probable, but the presence of mouldy tomatoes being included in processed tomato products is a possibility (Andersen & Frisvad, 2004). Thus, the presence of *Alternaria* spp. and their mycotoxins in tomato products should be evaluated in order to determine a potential risk to consumer health.

The current routine technique for detection and identification of *Alternaria* spp. often requires culture isolation and further morphological and physiological characterization (Simmons, 2007). This process is tedious and time-consuming, requiring days or weeks to obtain a definitive result. Moreover, because of the heat treatments used in food processing, viable microflora counts in the processed foodstuffs are extremely low, and traditional plating methods for the detection of microorganisms cannot be used (Zur, Shimoni, Hallerman, & Kashi, 2002). It should be noted that the mycotoxins produced in raw materials are not destroyed during most food processing operations, resulting in contamination of finished products (Andersen & Frisvad, 2004; Siegel, Feist, Proske, Koch, & Nehls, 2010).

*Alternaria* mycotoxins have been determined after separation by thin-layer chromatography (TLC), high performance thin-layer chromatography (HPTLC), gas chromatography (GC), and liquid chromatography (LC). However, High-performance liquid chromatography (HPLC) is the most widely used method for the detection of *Alternaria* toxins (Andersen, Smedsgaard, Jorring, Skouboe, & Pedersen, 2006; Magnani et al., 2007; Ostry, 2008; Patriarca et al., 2007; Pose et al., 2010). Even though these methods are sensitive and specific, they are time-consuming, very laborious, need skilled personnel, and require expensive and sophisticated equipment.

DNA based methods, such as the polymerase chain reaction (PCR), offer alternative tools for detection of viable and non-viable fungal species in food, and could be an indirect marker of the presence of mycotoxins in the foodstuffs (Pasquali et al., 2010).

In this study, a previously developed PCR method based on the ITS genetic marker (Pavón et al., 2011) was applied for detection of *Alternaria* spp. in raw and processed commercial tomato samples. Occurrence of *Alternaria* mycotoxins in the samples was analysed by HPLC in order to assess the ability of the PCR assay to identify tomato samples containing *Alternaria* mycotoxins.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample selection

Twenty samples of raw tomato fruits and 70 samples of tomato products (18 sun-dried tomato samples, 13 canned tomato products, 13 ketchup samples and 26 tomato sauces) were obtained from several local supermarkets and retail shops. Samples were

homogenized in a stomacher (IUL Instruments, Barcelona, Spain) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in airtight containers until used. Mould counts were determined by plating in Sabouraud-CAF (Liofilchem s.r.l., Roseto degli Abruzzi, Italy).

### 2.2. DNA extraction and PCR amplification

Total DNA extraction from raw tomato samples and tomato products was performed using the Wizard® DNA Clean-up System kit (Promega Corp., Madison, WI) as previously described (Pavón, González, Pegels, Martín, & García, 2010). DNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, DE).

Specific primer pair Dir1ITSAlt-Inv1ITSAlt was designed in a previous work for amplification of *Alternaria* spp. DNA (Pavón et al., 2011). These primers hybridize on the internal transcribed spacer (ITS1 and ITS2) regions of *Alternaria* spp., and delimit a DNA fragment of approximately 370 bp in all the *Alternaria* spp. analysed.

The primer pair 18Sfweu-18Srveu, designed by Martín et al. (2009), was used as positive amplification control of the assay. These universal primers were expected to amplify a conserved region of 99 bp of the 18S rRNA gene in all raw tomato samples and tomato products analysed.

PCR amplification reactions were done in a total volume of 25  $\mu\text{L}$ . Each reaction mixture contained 100 ng of template DNA, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  of each dNTP, 10 pmol of Dir1ITSAlt and Inv1ITSAlt primers, and 1 unit of *Thermus thermophilus* (Tth) DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain) in a reaction buffer supplied with the enzyme. PCR amplification was performed in a Progene thermal cycler (Techne, Ltd., Cambridge, UK) under the following conditions: an initial denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$  for 1 min, followed by 50 amplification cycles consisting of  $94^{\circ}\text{C}$  for 30 s for DNA denaturation,  $55^{\circ}\text{C}$  for 30 s for primers annealing, and  $72^{\circ}\text{C}$  for 45 s for DNA extension. A final extension step at  $72^{\circ}\text{C}$  for 5 min also was included. Positive control amplifications were set using 5 pmol of 18Sfweu-18Srveu primers combined in duplex PCR with Dir1ITSAlt-Inv1ITSAlt primer pair.

PCR products (10  $\mu\text{L}$ ) were mixed with 2  $\mu\text{L}$  of gel loading solution (Sigma, St. Louis, MO, USA), and loaded in a 2% D1 Low EEO (Hispanlab S.A.) agarose gel containing  $1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  ethidium bromide in Tris-acetate buffer. Electrophoretic separation was performed at 100 V for 30 min. The resulting DNA fragments were visualized by UV transillumination and analysed using a Chemidoc XRS System.

PCR products obtained from samples that tested negative for the presence of ALT, AOH or AME were gel-purified and sequenced as previously described (Pavón et al., 2010). The sequences obtained were searched for homology to those available at the GenBank-EMBL database using the BLAST program (NCBI software package).

### 2.3. HPLC analysis

#### 2.3.1. Extraction and cleanup

*Alternaria* mycotoxins extraction procedure was adapted from Magnani et al. (2007). Briefly, 1 g of tomato samples was extracted with 9 mL of acetonitrile (Panreac, Barcelona, Spain) containing 1% acetic acid (Panreac). This mixture was left in an ultrasonic bath for 5 min and then was filtered through Whatman 40 paper (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Both filter paper and the flask used during the extraction were washed out three times with 2 mL of the same solvent composition. The solvent was evaporated under vacuum with a Rotavapor® RE 111 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland), and the residue was reconstituted in 1 mL of methanol (JT Baker, Deventer, Holland). The reconstituted extract was



left in an ultrasonic bath for 1 min and then was diluted with 4 mL of milli-Q water. The cleanup was performed by applying this solution by gravity onto an Oasis HLB 3 cc (60 mg) extraction cartridge (Waters, Milford, MA, USA) previously conditioned with 2 mL of methanol and equilibrated with 2 mL of water. The cartridge was then washed with 2 mL of water and 2 mL of methanol–water (1 + 4). Finally, the toxins were eluted with 5 mL of 1% acetic acid in methanol. This fraction was concentrated under nitrogen flow and was reconstituted in 200  $\mu$ L of methanol.

### 2.3.2. Standard preparation

ALT, AOH and AME were purchased from Sigma, in crystallised form. A stock solution of 1000  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> was prepared in methanol and kept at -20 °C. A working solution (10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) was prepared in methanol. Standards for HPLC calibration and the standards for addition experiments were prepared by diluting working solutions.

### 2.3.3. HPLC conditions

All analyses were carried out using a HP-1200 high performance liquid chromatograph equipped with a diode array detector (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Approximately three UV spectra were collected per second from 200 to 600 nm along with chromatographic traces at 210 and 280 nm, all with a 4 nm resolution. The analytical column was a reversed phase Kinetex PFP (100  $\times$  2.1 mm; 2.6  $\mu$ m, Phenomenex, Torrance, CA, USA) preceded by a 4  $\times$  2 mm PFP guard column (Phenomenex). The injection volume was 1  $\mu$ L and the column temperature was 40 °C. The mobile phase consisted of a linear gradient acetonitrile–water with a flow rate of 0.3 mL min<sup>-1</sup> starting at 100% water, reaching 100% acetonitrile after 15 min. 100% acetonitrile was maintained for 3 min. Thereafter the gradient was returned to 100% water in 5 min and allowed to equilibrate for 3 min before the next analysis. Both eluents contained 50  $\mu$ L trifluoroacetic acid (Panreac) per litre. All solvents were HPLC grade and all chemicals were analytical grade. Working solutions were used for construction of five-point calibration curves (0.5, 1, 2, 5 and 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), plotting peak areas against concentration ( $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). The detection limit for each mycotoxin was calculated as three times the standard deviation of the blank divided by the slope of the calibration graph. The limit of quantification was calculated as ten times the standard deviation of the blank samples divided by the slope. Confirmation of the identity of ALT, AOH and AME fractions obtained from tomato samples was performed by electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS) analysis. All the ESI-MS experiments were performed using an ESQUIRE-LC (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) ion-trap spectrometer in negative mode. Scanning data were obtained in continuum mode over the mass range  $m/z$  100–500. Metabolite standards of ALT, AOH and AME were co-analysed for verification.

### 2.3.4. Standard addition experiments

Uncontaminated raw tomato samples, previously analysed with negative results for presence of *Alternaria* mycotoxins, were spiked with toxin working solutions (10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) to reach 0.5, 1 and 2.5  $\mu$ g g<sup>-1</sup> of ALT, AOH or AME. Spiked tomato samples were analysed using the same procedure described for the tomato samples (metabolite extraction, cleanup and HPLC analysis). Recovery tests were based on triplicate spiking and triplicate analysis.

## 3. Results and discussion

### 3.1. PCR assay development

The *Alternaria* specific primer pair Dir1ITSAlt-Inv1ITSAlt amplified a DNA fragment of approximately 370 bp in all the *Alternaria* spp (Pavón et al., 2011).

Commercial tomato products like tomato sauce, ketchup and canned tomato are heat and pressure treated products, where some degree of DNA degradation is possible, reducing the PCR signal. For this reason, the PCR amplification conditions were modified in this work, including fifty cycles of amplification, in order to guarantee a trustworthy *Alternaria* DNA detection, without compromising the sensitivity of PCR assay. No cross-species amplification was obtained from other fungal, bacterial, animal, or plant species analysed, despite the use of 50 amplification cycles (results not shown).

### 3.2. HPLC method performance

The developed HPLC method with diode-array detection was able to resolve the major toxins of *Alternaria* (ALT, AOH and AME) in less than 16 min, with retention times of 10.8, 12.8 and 15.6 min, respectively. Calibration curves for ALT, AOH and AME were drawn by linear regression of the least-squares method using peak area of the standard as response vs. concentration. The correlation coefficients were >0.999 for ALT and AME, and 0.98 for AOH. The limit of detection for ALT, AOH and AME were 1.7, 19.7 and 0.37  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, corresponding to 0.34, 3.94 and 0.074  $\mu$ g kg<sup>-1</sup>, respectively. The detection limit was calculated as three times the standard deviation of the blank divided by the slope of the calibration graph. The results of the level and precision of recoveries for the *Alternaria* mycotoxins tested are shown in Table 1. The average recoveries for three levels of addition ( $n = 9$ ) of pure standards to tomato paste were 98.4%, 111% and 97.1% for ALT, AOH and AME. Recoveries obtained in this work were equivalent to recoveries reported in other surveys of *Alternaria* toxins (Azcarate et al., 2008; Fente et al., 1998; Lau et al., 2003; Magnani et al., 2007).

### 3.3. Analysis of commercial tomato products

The detection of *Alternaria* DNA and the occurrence of ALT, AOH and AME in commercial tomato products are shown in Table 2. The PCR assay revealed the presence of *Alternaria* spp. DNA in 41 out of 90 samples (45.6%), while HPLC detected at least one of the *Alternaria* mycotoxins within 31 out of the 90 samples (34.4%). Twenty tomato fruit samples were analysed, 14 of which were mouldy fruits and 6 unspoiled tomatoes. Mould counts were negative in unspoiled peeled tomato samples, while counts in mouldy tomatoes were in the range of 10<sup>2</sup>–10<sup>3</sup> CFU/g. All the unspoiled tomatoes tested negative in the *Alternaria* PCR assay, and no *Alternaria* toxins were detected, whereas all the mouldy tomatoes showed amplification of *Alternaria* DNA, and the presence of toxins was confirmed in 11 of the 14 mouldy tomatoes (78.6%), with maximum concentrations of 11,780; 73,490 and 140  $\mu$ g kg<sup>-1</sup>, for ALT, AOH and AME, respectively. These concentrations of ALT and AOH are higher than those reported by Stinson, Osman, Heisler, Siciliano, and Bills (1981) in whole tomatoes, with a maximum level of 1100  $\mu$ g kg<sup>-1</sup> for ALT and 5300  $\mu$ g kg<sup>-1</sup> for AOH.

Regarding processed foodstuffs, in this study 27 out of 70 tomato products (38.6%) were positive in the analysis of *Alternaria* spp. DNA. Sun-dried tomato samples not only showed higher incidence of *Alternaria* DNA than canned tomato products, ketchup

**Table 1**  
Recoveries of ALT, AOH and AME added to tomato pulp, determined by HPLC.

Concentration ( $\mu$ g g <sup>-1</sup> )	Recovery (%) $\pm$ SD			Replicates
	ALT	AOH	AME	
0.5	98.2 $\pm$ 4.8	114.4 $\pm$ 2.5	101.3 $\pm$ 0.9	3
1	102.2 $\pm$ 3.8	112.8 $\pm$ 1.9	93.6 $\pm$ 1.9	3
2.5	94.8 $\pm$ 1.4	105.9 $\pm$ 4.3	96.5 $\pm$ 3.0	3

Table 2

Results obtained in the PCR and HPLC analysis (mean and standard deviation) of commercial tomato products.

Type of product (No samples)	<i>Alternaria</i> spp. PCR system <sup>a</sup>	ALT ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	AOH ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	AME ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Unspoiled tomatoes (6) <sup>a</sup>	—	nd <sup>bc</sup>	nd	nd
Mouldy tomatoes (3) <sup>b</sup>	+	nd	nd	nd
Mouldy tomato TA091	+	11,780 $\pm$ 190	73,490 $\pm$ 810	0
Mouldy tomato TA113	+	nd	26,960 $\pm$ 740	140 $\pm$ 2
Mouldy tomato TA114	+	nd	30,400 $\pm$ 170	64 $\pm$ 3
Mouldy tomato TA115	+	nd	29,270 $\pm$ 800	nd
Mouldy tomato TA116	+	5450 $\pm$ 100	29,530 $\pm$ 1060	57 $\pm$ 6
Mouldy tomato TA117	+	nd	24,670 $\pm$ 270	45 $\pm$ 6
Mouldy tomato TA118	+	nd	28,090 $\pm$ 320	nd
Mouldy tomato TA119	+	nd	31,610 $\pm$ 1450	nd
Mouldy tomato TA120	+	nd	28,830 $\pm$ 510	nd
Mouldy tomato TA121	+	nd	28,040 $\pm$ 410	57 $\pm$ 2
Mouldy tomato TA122	+	nd	27,510 $\pm$ 400	nd
Canned tomatoes (11) <sup>c</sup>	—	nd	nd	nd
Canned tomato TA035	+	870 $\pm$ 70	nd	nd
Canned tomato TA062	+	740 $\pm$ 10	nd	nd
Ketchup (7) <sup>d</sup>	—	nd	nd	nd
Ketchup (2) <sup>e</sup>	+	nd	nd	nd
Ketchup TA068	+	21,320 $\pm$ 490	nd	nd
Ketchup TA074	+	nd	680 $\pm$ 40	nd
Ketchup TA075	+	nd	460 $\pm$ 10	nd
Ketchup TA077	+	910 $\pm$ 30	nd	nd
Sun-dried tomatoes (6) <sup>f</sup>	—	nd	nd	nd
Sun-dried tomato TA030	+	nd	350 $\pm$ 20	112 $\pm$ 2
Sun-dried tomato TA031	+	nd	60 $\pm$ 1	118 $\pm$ 10
Sun-dried tomato TA072	+	380 $\pm$ 30	170 $\pm$ 10	72 $\pm$ 4
Sun-dried tomato TA073	+	nd	420 $\pm$ 20	54 $\pm$ 4
Sun-dried tomato TA096	+	nd	340 $\pm$ 30	38 $\pm$ 4
Sun-dried tomato TA097	+	nd	350 $\pm$ 10	39 $\pm$ 2
Sun-dried tomato TA098	+	nd	980 $\pm$ 40	nd
Sun-dried tomato TA099	+	280 $\pm$ 30	620 $\pm$ 40	nd
Sun-dried tomato TA100	+	nd	300 $\pm$ 40	nd
Sun-dried tomato TA101	+	nd	620 $\pm$ 20	nd
Sun-dried tomato TA102	+	1010 $\pm$ 10	430 $\pm$ 30	nd
Sun-dried tomato TA103	+	nd	300 $\pm$ 40	nd
Tomato sauce (19) <sup>g</sup>	—	nd	nd	nd
Tomato sauce (5) <sup>h</sup>	+	nd	nd	nd
Tomato sauce TA044	+	19,220 $\pm$ 300	nd	nd
Tomato sauce TA060	+	22,820 $\pm$ 70	nd	nd

<sup>a</sup> (+) Amplification of the 370 bp amplicon from *Alternaria* spp./ (—) No amplification of the PCR product.<sup>bc</sup> Not detected. <0.34  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for ALT, <3.94  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for AOH, and <0.074  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for AME.<sup>a</sup> Unspoiled tomatoes: TA028, TA029, TA094, TA095, TA111 and TA112.<sup>b</sup> Mouldy tomatoes: TA090, TA092 and TA093.<sup>c</sup> Canned tomatoes: TA032, TA033, TA034, TA052, TA053, TA063, TA065, TA066, TA086, TA087 and TA108.<sup>d</sup> Ketchup: TA036, TA037, TA038, TA039, TA040, TA069 and TA076.<sup>e</sup> Ketchup: TA078 and TA079.<sup>f</sup> Sun-dried tomatoes: TA071, TA104, TA105, TA056, TA057 and TA058.<sup>g</sup> Tomato sauce: TA042, TA043, TA045, TA048, TA049, TA051, TA059, TA061, TA067, TA080, TA081, TA082, TA083, TA084, TA085, TA088, TA089, TA106 and TA107.<sup>h</sup> Tomato sauce: TA046, TA047, TA050, TA109 and TA110.

or tomato sauces, but also higher incidence of mycotoxins. As shown in Table 2, 12 out of 18 sun-dried tomato samples (66.7%) contained *Alternaria* DNA, and they were also contaminated with *Alternaria* toxins, with a maximum concentration of ALT, AOH and AME of 1010; 980 and 118  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively. On the contrary, only 2 out of 13 (20.5%) canned tomato products were positive in the analysis of *Alternaria* DNA and only ALT was detected, with a maximum concentration of 870  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Moreover, 6 out of 13 (46.2%) ketchup samples tested positive for the amplification of *Alternaria* spp. DNA, four of which were also contaminated with ALT or AOH, with a maximum level of 21,320 and 680  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively. Finally, 7 out of 26 (26.9%) tomato sauces were positive by PCR, ALT was the only mycotoxin detected, and it was present in two of the tomato sauces analysed, with a maximum concentration of 22,820  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . The high incidence of *Alternaria* mycotoxins in sun-dried tomato samples could be due to the drying process, particularly during the early stages, when the

environmental conditions are appropriate for *Alternaria* growth and mycotoxin production. It should be noted that the mould counts in the sun-dried tomato samples that tested positive by PCR were in the range of 10–100 CFU/g, but plating on Sabouraud-CAF did not show the presence of viable moulds in the rest of tomato products analysed.

A common problem of PCR-based methods for food analysis is failure of DNA amplification due to the presence of inhibitory substances in the samples or to DNA shearing. Thus, it is essential to include positive controls in order to avoid false-negative results. The absence of the control product would indicate a technical problem in the process and would avoid false-negative findings (Zur et al., 2002). For this reason, a positive amplification control was performed in each PCR experiment by using 18Sfweu and 18Srveu primers. These primers successfully amplified a conserved 99 bp fragment on the 18S rRNA gene of all the food samples analysed. These results confirm that the food samples appearing



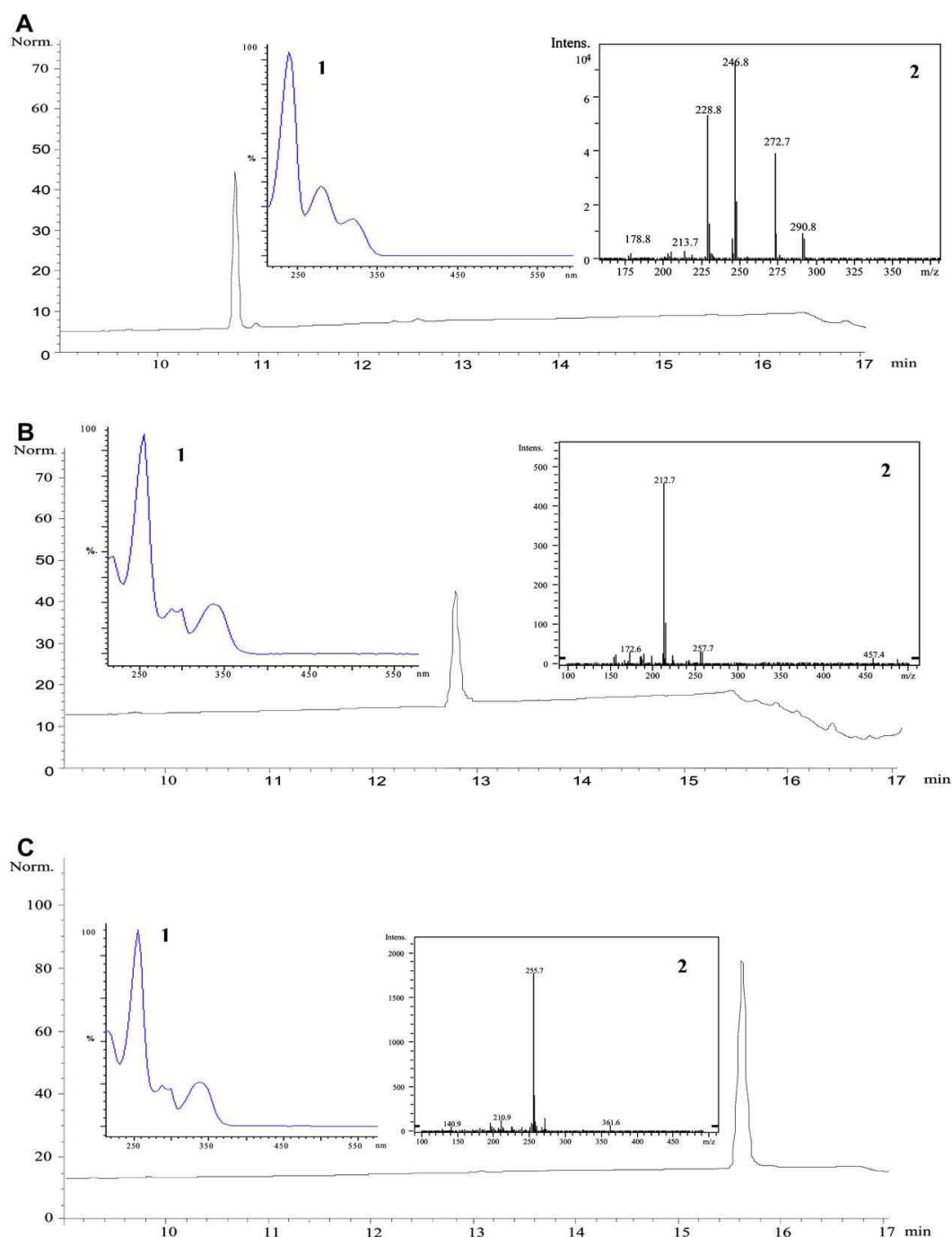


Fig. 1. HPLC-DAD and MS analysis of *Alternaria* mycotoxin standards. UV–VIS chromatogram (210 nm) from ALT (A), AOH (B), and AME (C). The numbers 1 and 2 refer to UV–VIS (200–600 nm) and ESI-MS spectra of the target compound, respectively.

negative in the *Alternaria*-specific PCR assay did not correspond to false-negative results.

*Alternaria* mycotoxins were not detected in 7 of the 27 processed tomato samples (2 ketchup samples and 5 tomato sauces, 25.9%)

and 3 of the 14 mouldy tomatoes (21.4%) that tested positive by PCR. The absence of ALT, AOH and AME in a positive PCR sample can be explained by several reasons. First, it could be due to contamination by *Alternaria* species that do not produce the mycotoxins

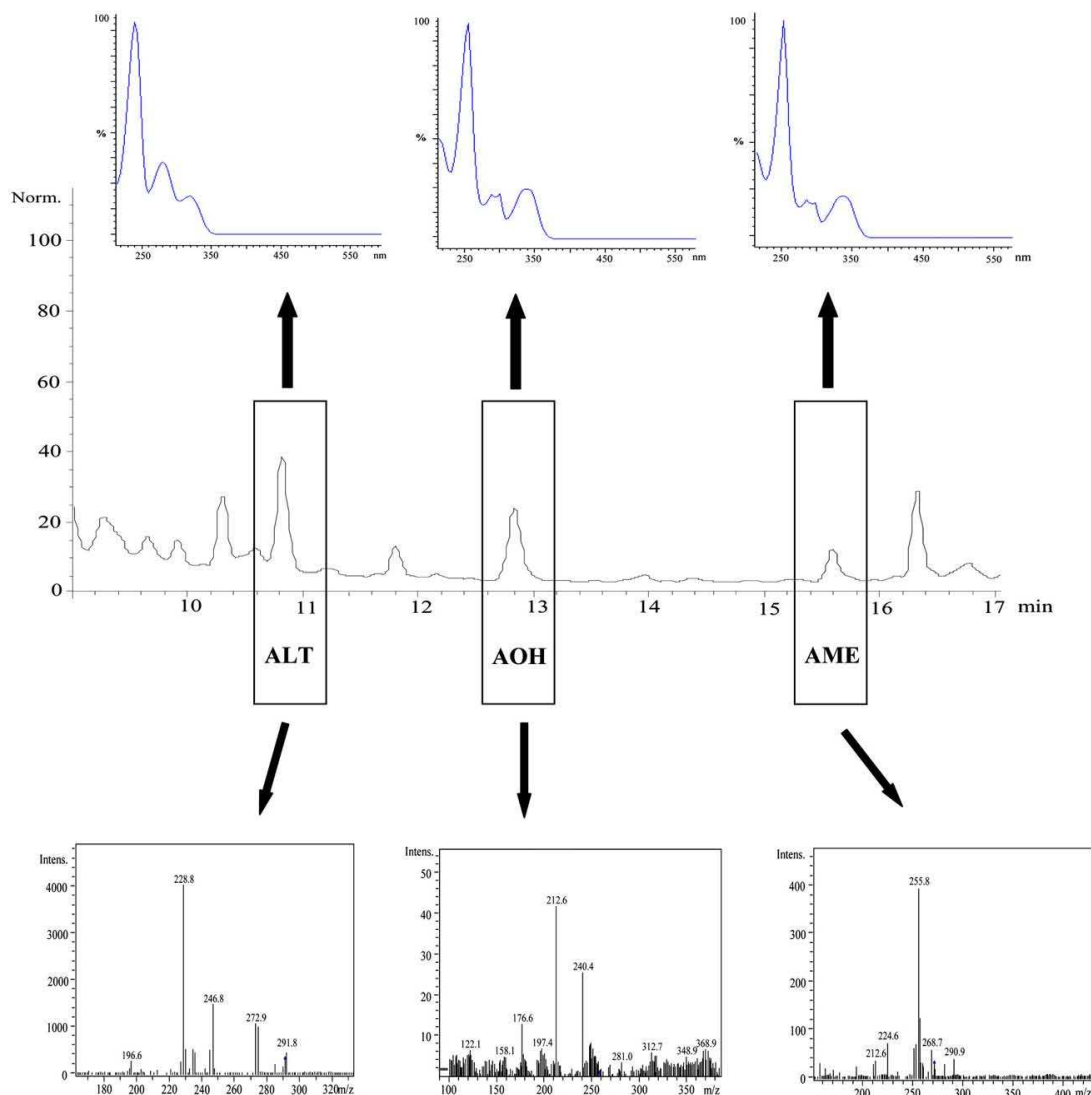


Fig. 2. HPLC-DAD and MS analysis of sun-dried tomato A extract where ALT, AOH and AME were tentatively identified. UV–VIS chromatogram (210 nm) from sample extract. UV–VIS spectra (200–600 nm) of the target compounds are shown above the chromatogram, and the corresponding ESI-MS spectra at the bottom of the figure.

analysed, like those from the *Alternaria infectoria* species-group, which produce metabolites like infectopyrones and novaezelandins, but not ALT, AOH or AME (Andersen, Sorensen, Nielsen, van den Ende, & de Hoog, 2009; Christensen et al., 2005). Moreover, some species from the *Alternaria alternata* species-group, like *Alternaria longipes*, do not always produce these mycotoxins (Andersen, Kroger, & Roberts, 2001). Furthermore, not only does the production depend on the fungal strain, but also on the substrate on which it grows and on the environmental growth conditions.

Sequence analysis of the PCR products obtained from the samples that tested positive for *Alternaria* DNA and negative for the presence of mycotoxins was performed to identify the *Alternaria* species-groups present in those samples. The sequences obtained have been registered in the EMBL database with the following accession

numbers: tomato sauce TA046 (FR863589), tomato sauce TA047 (FR863590), tomato sauce TA050 (FR863591), tomato sauce TA109 (FR863597), tomato sauce TA110 (FR863598), mouldy tomato TA090 (FR863592), mouldy tomato TA092 (FR863593), mouldy tomato TA093 (FR863594), ketchup TA078 (FR863595) and ketchup TA079 (FR863596). DNA from *A. infectoria* species-group was detected in three tomato sauce samples (TA050, TA109 and TA110) and in the three mouldy tomatoes analysed (TA090, TA092 and TA093), explaining why ALT, AOH and AME were absent in these samples. Moreover, DNA from *A. alternata* species-group was present in two tomato sauce samples (TA046 and TA047) and two ketchup samples (TA078 and TA079). As stated above, some species from this group may not produce the mycotoxins analysed, but sequencing of the ITS PCR products did not allow identification up to the species level in the *A. alternata* species-group (Pavón et al., 2011).

In order to confirm the identity of the *Alternaria* mycotoxins detected in tomato products by HPLC-diode array, the positive samples were subjected to ESI-MS analysis. ALT, AOH and AME fragment ions obtained from the positive samples analysed resemble those obtained from the standards (Figs. 1 and 2).

Since *Alternaria* species are ubiquitous in nature and occur commonly as post-harvest pathogens of tomatoes, it is not surprising that *Alternaria* mycotoxins are found in tomato products (Pose et al., 2010). The concentration of AOH detected in processed tomato products was lower than that reported by Terminiello et al. (2006) in tomato puree samples (187–8756 µg kg<sup>-1</sup>). Moreover, higher concentrations of AME have been reported by Stinson et al. (1981) and Terminiello et al. (2006), with maximum concentrations of 800 and 1734 µg kg<sup>-1</sup>, respectively. In Brazil, da Motta and Valente Soares (2001) reported that no AOH or AME was detected in 80 samples of tomato products.

In this work, a good correlation was found between PCR detection of DNA from *Alternaria* and the presence of ALT, AOH or AME in tomato samples. The results revealed that 31 out of 41 (75.6%) PCR positive samples were contaminated with at least one of the *Alternaria* mycotoxins analysed. A positive correlation between the PCR detection of fungal DNA and mycotoxins has been reported for *Fusarium culmorum* and the presence of nivalenol in cereal samples (Pasquali et al., 2010). Also, Sarlin et al. (2006) reported a correlation between *Fusarium graminearum* DNA concentration and the deoxynivalenol content in North American barley and malt samples.

Although *Alternaria* spp. are the most frequent fungal species invading tomatoes (Barkai-Golan & Paster, 2008; Logrieco, Moretti, & Solfrizzo, 2009), so far there are no specific regulations for any of the *Alternaria* toxins in foods. However, considering their potential effects on human health and the frequency of their presence in tomato products, systematic testing for *Alternaria* mycotoxins in these commodities is desirable to evaluate the consumer health risk (Pose et al., 2010; Terminiello et al., 2006).

In conclusion, a positive correlation has been demonstrated between the PCR detection of *Alternaria* DNA and the presence of ALT, AOH or AME in the raw and processed tomato products. Accordingly, this PCR-based assay could be used as a quality and biosecurity marker of raw materials or processed food where *Alternaria* spp. and their toxins can be present.

## Acknowledgements

This study was supported by Grant No. AGL 2006-07659 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the Programa de Vigilancia Sanitaria 2009/AGR-1489 from the Comunidad de Madrid (Spain). Miguel Ángel Pavón is recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

Authors thank Nour Kayali (CAI Espectrometría de Masas, UCM) for his assistance with mass analysis.

## References

- An, Y. H., Zhao, T. Z., Miao, J., Liu, G. T., Zheng, Y. Z., Xu, Y. M., et al. (1989). Isolation, identification and mutagenicity of alternariol monomethyl ether. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 1341–1343.
- Andersen, B., & Frisvad, J. (2004). Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7507–7513.
- Andersen, B., Kroger, E., & Roberts, R. G. (2001). Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research*, 105, 291–299.
- Andersen, B., Smedsgaard, J., Jørring, I., Skouboe, P., & Pedersen, L. H. (2006). Real-time PCR quantification of the AM-toxin gene and HPLC qualification of toxicogenic metabolites from *Alternaria* species from apples. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 105–111.
- Andersen, B., Sørensen, J. L., Nielsen, K. F., van den Ende, B. G., & de Hoog, S. (2009). A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectoria* species-group. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 642–656.
- Azcarate, M. P., Patriarca, A., Terminiello, L., & Fernández, V. (2008). *Alternaria* toxins in wheat during the 2004 to 2005 Argentinean harvest. *Journal of Food Protection*, 71, 1262–1265.
- Barkai-Golan, R., & Paster, N. (2008). Moldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 1. *World Mycotoxin Journal*, 1, 147–159.
- Bottalico, A., & Logrieco, A. (1998). Toxicogenic *Alternaria* species of economic importance. In K. K. Sinha, & D. Bhatnagar (Eds.), *Mycotoxins in agriculture and food safety* (pp. 65–108). New York, USA: Marcel Dekker Inc.
- Christensen, K. B., van Klink, J. W., Weavers, R. T., Larsen, T. O., Andersen, B., & Phipps, R. K. (2005). Novel chemotaxonomic markers for the *Alternaria infectoria* species-group. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9431–9435.
- Delgado, T., & Gómez-Cordovés, C. (1998). Natural occurrence of alternariol and alternariol methyl ether in Spanish apple juice concentrates. *Journal of Chromatography A*, 815, 93–97.
- Fente, C. A., Jaimez, J., Vázquez, B. I., Franco, C. M., & Cepeda, A. (1998). Determination of alternariol in tomato paste using solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analyst*, 123, 2277–2280.
- Jackson, L. S., & Al-Tajer, F. (2008). Factors affecting mycotoxin production in fruits. In R. Barkai-Golan, & N. Paster (Eds.), *Mycotoxins in fruits and vegetables* (pp. 75–104). San Diego, CA, USA: Elsevier Scientific Publishers.
- Lau, B., Scott, P. M., Lewis, D., Kanhere, S., Cleroux, C., & Roscoe, V. (2003). Liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in fruit juices and beverages. *Journal of Chromatography A*, 998, 119–131.
- Lehmann, L., Wagner, J., & Metzler, M. (2006). Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 398–408.
- Liu, G., Qian, Y., Zhang, P., Dong, W., Qi, Y., & Guo, H. (1992). Etiological role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer. *Chinese Medical Journal*, 105, 394–400.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, M., Moretti, A., & Perrone, G. (2003). Epidemiology of toxicogenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 645–667.
- Logrieco, A., Moretti, A., & Solfrizzo, M. (2009). *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*, 2, 129–140.
- Magnani, R. F., De Souza, G. D., & Rodrigues-Filho, E. (2007). Analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether on flavedo and albedo tissues of tangerines (*Citrus reticulata*) with symptoms of *Alternaria* brown spot. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4980–4986.
- Mansfield, M. A., Archibald, D. D., Jones, A. D., & Kulda, G. A. (2007). Relationship of sphinganine analog mycotoxin contamination in maize silage of seasonal weather conditions and to agronomic and ensiling practices. *Phytopathology*, 97, 504–511.
- MARM, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. (2009). *Base de Datos de Consumo en Hogares*. Available at <http://www.marm.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/panel-de-consumo-alimentario/base-de-datos-de-consumo-en-hogares/consulta10.asp>.
- MARM, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. (2010). *Avances de Superficies y Producciones de Cultivos, Agosto 2010*. Available at [http://www.marm.es/es/estadistica/temas/avances-de-superficies-y-producciones-de-cultivos/Avances\\_Cultivos\\_2010-08\\_tcm7-48629.pdf](http://www.marm.es/es/estadistica/temas/avances-de-superficies-y-producciones-de-cultivos/Avances_Cultivos_2010-08_tcm7-48629.pdf).
- Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Pegels, N., Hernández, P. E., et al. (2009). SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. *Meat Science*, 82, 252–259.
- Medina, A., Valle-Algarra, F. M., Mateo, R., Gimeno-Adelantado, J. V., Mateo, F., & Jiménez, M. (2006). Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 196–203.
- da Motta, S., & Valente Soares, L. (2001). Survey of Brazilian tomato products for alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and cyclopiazonic acid. *Food Additives and Contaminants*, 18, 630–634.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. (2011). *Basic local alignment search tool*. Available at <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Ostry, V. (2008). *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*, 1, 175–188.
- Panigrahi, S., & Dallin, S. (1994). Toxicity of the *Alternaria* spp metabolites, tenuazonic acid, alternariol, altertoxin-I, and alternariol monomethyl ether to brine shrimp (*Artemia salina* L) larvae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66, 493–496.
- Pasquali, M., Giraud, F., Brochot, C., Cocco, E., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2010). Genetic *Fusarium* chemotyping as a useful tool for predicting nivalenol contamination in winter wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 246–253.
- Patriarca, A., Azcarate, M. P., Terminiello, L., & Fernández, V. (2007). Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinean wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 219–222.



- Pavón, M. A., González, I., Pegels, N., Martín, R., & García, T. (2010). PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a 1. *Food Control*, 21, 1745–1756.
- Pavón, M. A., González, I., Rojas, M., Pegels, N., Martín, R., & García, T. (2011). PCR detection of *Alternaria* spp. in processed foods, based on the internal transcribed spacer genetic marker. *Journal of Food Protection*, 74, 240–247.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (1997). *Fungi and food spoilage*. London: Blackie Academic and Professional.
- Pose, G., Patriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A., & Fernández, V. (2010). Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 348–353.
- Pozzi, C. R., Braghini, R., Arcaro, J., Zorzete, P., Israel, A. L., Pozar, I. O., et al. (2005). Mycoflora and occurrence of alternariol and alternariol monomethyl ether in Brazilian sunflower from sowing to harvest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5824–5828.
- Sarlin, T., Yli-Mattila, T., Jestoi, M., Rizzo, A., Paavanen-Huhtala, S., & Haikara, A. (2006). Real-time PCR for quantification of toxigenic *Fusarium* species in barley and malt. *European Journal of Plant Pathology*, 114, 371–380.
- Scott, P. M., & Stolz, D. R. (1980). Mutagens produced by *Alternaria alternata*. *Mutation Research*, 78, 33–40.
- Siegel, D., Feist, M., Proske, M., Koch, M., & Nehls, I. (2010). Degradation of the *Alternaria* mycotoxins alternariol, alternariol monomethyl ether, and altenuene upon bread baking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9622–9630.
- Simmons, E. G. (2007). *Alternaria. An identification manual*. Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre.
- Solfrizzo, M., de Girolamo, A., Vitti, C., Visconti, A., & van den Bulk, R. (2004). Liquid chromatographic determination of *Alternaria* toxins in carrot. *Journal of AOAC International*, 87, 101–106.
- Stinson, E., Osman, S., Heisler, E., Siciliano, J., & Bills, D. (1981). Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges and lemons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 790–792.
- Terminiello, L., Patriarca, A., Pose, G., & Fernández, V. (2006). Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean tomato puree. *Mycotoxin Research*, 22, 236–240.
- Visconti, A., Logrieco, A., & Bottalico, A. (1986). Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in olive: their production and possible transfer into the oil. *Food Additives and Contaminants*, 3, 323–330.
- Visconti, A., Sibilia, A., & Sabia, A. (1992). *Alternaria alternata* from oilseed rape: mycotoxin production and toxicity to *Artemia salina* larvae and rape seedlings. *Mycotoxin Research*, 8, 9–12.
- Yekeler, H., Bitmis, K., Özcelik, N., Doymaz, M. Z., & Calt, M. (2001). Analysis of toxic effects of *Alternaria* toxins on oesophagus of mice by light and electron microscopy. *Toxicologic Pathology*, 29, 492–497.
- Zur, G., Shimoni, E. M., Hallerman, E., & Kashi, Y. (2002). Detection of *Alternaria* fungal contamination in cereal grains by a polymerase chain reaction-based assay. *Journal of Food Protection*, 65, 1433–1440.

### III.3. DETECTION AND CUANTIFICATION OF *ALTERNARIA* SPP. IN FOODSTUFFS BY REAL-TIME PCR TECHNIQUES

#### III.3.1. REAL-TIME PCR

- ITS-based detection and quantification of *Alternaria* spp. in raw and processed vegetables by real-time quantitative PCR



***Food Microbiology***  
Volume 32, pages 165-171, 2012

#### III.3.2. REAL-TIME RT-PCR

- A real-time reverse-transcriptase PCR technique for detection and quantification of viable *Alternaria* spp. in foodstuffs



***Food Control***  
Volume 28, pages 286-294, 2012







## ITS-based detection and quantification of *Alternaria* spp. in raw and processed vegetables by real-time quantitative PCR

Miguel Ángel Pavón, Isabel González, Rosario Martín, Teresa García Lacarra\*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 September 2011

Received in revised form

9 May 2012

Accepted 15 May 2012

Available online 24 May 2012

#### Keywords:

TaqMan real-time PCR

*Alternaria* spp.

Commercial foodstuffs

### ABSTRACT

A TaqMan real-time polymerase chain reaction (PCR) method was developed for specific detection of *Alternaria* spp. in foodstuffs. The method uses *Alternaria*-specific primers and probe targeting the internal transcribed spacer regions ITS1 and ITS2 of the rRNA gene, and a positive amplification control based on 18S rRNA gene. The applicability of the real-time PCR protocol was assessed through analysis of 190 commercial food samples, including 80 fresh fruit and vegetable samples and 110 processed foodstuffs. The assay demonstrated the presence of *Alternaria* spp. DNA in 46 out of the 80 raw samples (57.5%) and in 66 out of the 110 processed samples (60%), enabling quantitative detection of *Alternaria* spp. DNA at levels as low as 1 CFU/g. The estimated *Alternaria* counts obtained by real-time PCR showed a good relationship ( $R^2 = 0.9006$ ,  $P < 0.01$ ) with the *Alternaria* counts obtained by plating on Potato Carrot Agar (PCA). The developed real-time PCR assay provides a useful tool for early detection of *Alternaria* spp. and could be applied as a quality and biosecurity marker of raw materials and final products in the fruits and vegetables processing industries.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Alternaria* is a fungal genus that includes saprophytic and pathogenic species and its spores can be found in a wide range of different habitats such as seeds, plants, agricultural commodities, the soil and the atmosphere. The pathogenic species of the genus *Alternaria* can cause losses in agriculture by reducing crop yield in the field and through spoilage during storage (Barkai-Golan, 2001; Ostry, 2008). In addition to spoiling fruits and vegetables through disease development, *Alternaria* species are also capable of producing a range of toxic metabolites including phytotoxins that play roles in fungal pathogenicity, and several mycotoxins, harmful to humans and animals, which has been related to a range of pathologies, from hematological disorders to esophageal cancer (Liu et al., 1992; Simmons, 2007; Ostry, 2008; Logrieco et al., 2009).

There are about 300 known *Alternaria* species and their classification is very complex. They have been clustered in several species-groups according to phylogenetic studies and sporulation patterns (Chou and Wu, 2002; Hong et al., 2005; Simmons, 2007). *Alternaria alternata* produces crop diseases like black mold of tomato, black rot of olive and citrus, black point of small cereals, core rot of apples, and black mold of sunflower, oilseed rape,

pepper, melon and strawberries (Giryn and Szeke, 1995; Serdani et al., 2002; Logrieco et al., 2003; Pozzi et al., 2005). Moreover, tenuazonic acid (TeA), alternariol (AOH), alternariol mono-methyl ether (AME), and altenuene (ALT) have been detected in the food-stuff samples infected by *A. alternata*. The species associated to *Alternaria* carrot infection are *A. alternata* and *Alternaria radicina*. While *A. alternata* is commonly isolated from carrot seeds and roots, *A. radicina* is primarily a root pathogen and cause black necrotic lesions on the carrot crown and root, where mycotoxins (TeA, AOH and AME) and phytotoxic compounds (radicinin and radicinol) have been detected (Tylkowska, 1992; Konstantinova et al., 2002; Solfrizzo et al., 2005). Because *Alternaria* species are associated with a wide range of diseases in many plants of a high agrifood value, there is a need for a rapid and reliable method to detect *Alternaria* spp. during early spoilage, so that growers and food processing industries could establish control strategies to prevent major economical losses.

Culture based identification and quantification of *Alternaria* spp. require a lot of expertise in morphology-based taxonomy, and it is a tedious and time-consuming procedure (Simmons, 2007). In contrast, genetic methods are fast and sensitive alternative approaches for the detection of food spoilage and pathogenic microorganisms. DNA-based methods were previously described for the detection of *Alternaria* spp. (Pavón et al., 2010, 2011). However, fungal quantification using these protocols is not possible. As an alternative, real-time PCR provides a tool for accurate and

\* Corresponding author. Tel.: +34 913943747; fax: +34 913943743.  
E-mail address: [tgarcia@vet.ucm.es](mailto:tgarcia@vet.ucm.es) (T. García Lacarra).



sensitive quantification of target fungal DNA in foodstuffs. Furthermore, because real-time PCR does not require electrophoresis, it is less laborious than conventional PCR, and it is therefore suitable for automation and high throughput testing (Gil-Serna et al., 2009).

The aim of this work was to develop a real-time PCR method based on the multicopy ITS genetic marker for the detection and quantification of *Alternaria* spp. in foodstuffs.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample selection and DNA extraction

Eighty samples of fresh fruits and vegetables, 44 of which showed some evidence of spoilage, and 110 samples of processed foodstuffs (90 tomato products and 20 dried pepper samples) were obtained from several local supermarkets and retail shops. Samples were homogenized in a stomacher (IUL Instruments, Barcelona, Spain) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in airtight containers until used. *Alternaria* counts were determined by plating in Sabouraud-CAF (Liofilchem s.r.l., Roseto degli Abruzzi, Italy). Fungal colonies grown after incubation at  $25^{\circ}\text{C}$  for 48 h, were transferred onto a PCA plate (potato carrot agar; Simmons, 2007) and incubated under alternating light/dark cycles consisting of 8 h of cool-white daylight fluorescent lamps followed by 16 h of darkness. *Alternaria* colonies were identified according to Simmons (2007) and Samson et al. (2004) with the aid of a stereomicroscope Olympus SZX10 (Olympus, Hamburg, Germany) and a microscope Olympus BX40 (400 $\times$  magnification) (Olympus).

Total DNA extraction and purification from 200 mg of sample was performed using the Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-up System kit (Promega Corp., Madison, WI) as previously described (Pavón et al., 2010). DNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, DE).

### 2.2. Primers and probe design

The oligonucleotides Dir1ITSalt and Inv1ITSalt (Pavón et al., 2011) were previously designed on the basis of rDNA sequences from various fungal, animal and plant species available in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database. These primers hybridize on the internal transcribed spacer regions (ITS1 and ITS2) of *Alternaria* spp., and delimit a DNA fragment of approximately 370 bp in all the *Alternaria* spp. analysed.

A Taqman probe, AltTM (5' 6FAM-AACACCAAGCAAAGCTT-GAGGTACAAAT-TMR 3') was designed with the aid of the EMBOSS software package, version 2.2.0, and Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) based on alignment and comparison of the fragment generated by amplification of the corresponding *Alternaria* target, and was labelled on the 5' end with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM), and on the 3' end with 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine (TAMRA). TaqMan probe was synthesized by TibMolBiol (Berlin, Germany).

Universal primers (18Sfweu/18Srveu) and probe (18STM) designed by Martín et al. (2009), were used as positive amplification control of the assay. These primers were expected to amplify a conserved region of 99 bp of the 18S rRNA gene in all the eukaryotic species.

### 2.3. Real-time PCR

Real-time PCR was run under generic cycling conditions. The optimum PCR concentrations of primers yielding the highest endpoint fluorescence and the lowest  $C_p$  were experimentally determined for each set of primers: 300 nM for forward primers and

900 nM for reverse primers. The PCR reactions were carried out using the LightCycler<sup>®</sup> TaqMan<sup>®</sup> Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 2 pmol of each TaqMan probe (TibMolBiol), and 100 ng of DNA from commercial food samples or 2  $\mu\text{l}$  DNA from *A. alternata* culture dilutions and inoculated tomato samples. Amplification reactions were performed in a total reaction volume of 10  $\mu\text{l}$  in a glass capillary tube and were run on the LightCycler<sup>®</sup> 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Pensberg, Germany) with the following program: 10 min at  $95^{\circ}\text{C}$  (denaturation and Taq polymerase activation), an amplification program of 45 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 s,  $60^{\circ}\text{C}$  for 60 s, and  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 s. Samples were then cooled to  $40^{\circ}\text{C}$  for 30 s. The same program was used to amplify the *Alternaria*-specific PCR system, and the positive amplification control. Real-time PCR reactions were carried out in triplicate for each DNA extract. The crossing point value ( $C_p$ ), which refers to the cycle number where the sample's fluorescence significantly increases above the background level, was calculated automatically by the LightCycler<sup>®</sup> software as the first maximum of the second derivative of the curve.

### 2.4. Standard curves

Standard curves were obtained using 10-fold dilutions of an *A. alternata* CBS 117143 culture grown in malt extract broth for 4 days at  $25^{\circ}\text{C}$ . Standard curves were prepared in PBS and in aseptically obtained tomato pulp, with *A. alternata* counts in the range of  $1 \times 10^6$ – $1 \times 10^1$  CFU/ml, corresponding to theoretical DNA concentrations ranging from  $3 \times 10^3$  to  $3 \times 10^4$  ng per reaction. DNA concentrations were estimated from DNA measurements of the first two culture dilutions ( $1 \times 10^6$  and  $1 \times 10^5$  CFU/ml). PCR amplification reactions were carried out in triplicate in two independent experiments. Standard curves were plotted as the  $C_p$  values against the logarithm of the counts of *A. alternata* dilutions plated in Sabouraud-CAF. The amplification efficiency,  $E$ , was calculated from the slope of the standard curve using the following formula (Bustin et al., 2009):

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

$$\% \text{ Efficiency} = (E - 1) \times 100$$

Additionally, precision of the assay was evaluated by comparing the coefficient of variation (CV) values obtained in three different days versus those obtained in the same day, to assess the influence of the day of analysis in the data obtained from the foodstuff samples.

### 2.5. Specificity and sensitivity of the real-time PCR

The specificity of the primers and probe was tested by real-time PCR analysis of DNA obtained from 11 *Alternaria* species and also from several fungal, bacterial, yeast, animal and plant species.

Sensitivity assays were carried out on *A. alternata* culture dilutions and artificially inoculated tomato pulp. To analyse the influence of thermal treatments on the assay performance, 20 ml of the *A. alternata* malt extract culture was heated at  $90^{\circ}\text{C}$  for 5 min. Tomato pulp samples (0.9 ml) were inoculated with 0.1 ml of  $10^6$  to  $10^1$  CFU/ml (either viable or heat treated), determined by plate count in Sabouraud-CAF. After DNA isolation of the *A. alternata* culture dilutions and inoculated tomato samples, the PCR reactions were carried out in triplicate in 3 independent experiments. One milliliter non-inoculated tomato pulp was included as a negative control.

### 2.6. Statistical analysis of data

All statistical analyses were performed using Statgraphics Centurion 15.2.14 (XV) (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton,

Virginia, USA). Linear correlation was applied to model the relationship between Ct values obtained from inoculated tomato pulp and the logarithm of *Alternaria* counts. Pearson correlation analysis was used to evaluate the relationships between the estimated *Alternaria* counts and the plate counts obtained as described above.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Assay development

The real-time PCR assay developed in this work is based on a genus-specific primer pair and a TaqMan probe designed on the internal transcribed spacer regions ITS1 and ITS2. The use of ITS regions to develop specific primers instead of single copy genes (either constitutive or toxin biosynthetic genes) enhances the sensitivity of the assay due to its multi copy character (Suarez et al., 2005; Gil-Serna et al., 2009).

The specificity of the real-time PCR system (primers and probe) was assessed by analysis of the DNA extracted from 23 *Alternaria* strains, belonging to 11 species of this genus, and also from several fungal, bacterial, yeast, animal and plant species (Table 1). In the *Alternaria* PCR system all the *Alternaria* species were amplified, with

**Table 1**  
Specificity of the *Alternaria*-specific (ITS) and positive amplification control (18S rRNA) real-time PCR systems. Cp values (mean and standard deviation) were obtained from 100 ng DNA in triplicate assays.

Species	<i>Alternaria</i> spp. PCR system	18S rRNA PCR system
<i>Alternaria alternata</i> CBS 154.31	11.73 ± 0.07	12.09 ± 0.23
<i>A. alternata</i> CBS 117130	10.98 ± 0.03	13.22 ± 0.14
<i>A. alternata</i> CBS 117143	11.04 ± 0.09	13.35 ± 0.11
<i>A. arborescens</i> CBS 109730	11.63 ± 0.02	12.59 ± 0.29
<i>A. arborescens</i> MAP05	11.30 ± 0.12	11.78 ± 0.15
<i>A. citri</i> CBS 192.81	11.74 ± 0.03	14.67 ± 0.23
<i>A. dauci</i> CBS 101592	12.55 ± 0.27	14.21 ± 0.54
<i>A. gaisen</i> CBS 632.93	11.49 ± 0.11	14.02 ± 0.21
<i>A. infectoria</i> CBS 210.86	11.61 ± 0.20	11.38 ± 0.07
<i>A. infectoria</i> MAP03	11.07 ± 0.06	11.89 ± 0.23
<i>A. infectoria</i> MAP04	10.99 ± 0.18	11.14 ± 0.13
<i>A. infectoria</i> MAP08	11.76 ± 0.05	12.45 ± 0.19
<i>A. longipes</i> CBS 917.96	12.07 ± 0.09	11.09 ± 0.03
<i>A. porri</i> CBS 109.41	11.62 ± 0.15	11.89 ± 0.21
<i>A. radicina</i> var. <i>radicina</i> CBS 245.67	11.88 ± 0.04	13.09 ± 0.09
<i>A. solani</i> CBS 347.79	12.82 ± 0.18	11.67 ± 0.12
<i>A. tenuissima</i> CBS 880.95	11.58 ± 0.15	14.21 ± 0.03
<i>A. tenuissima</i> MAP01	11.35 ± 0.05	13.11 ± 0.33
<i>A. tenuissima</i> MAP02	11.66 ± 0.13	11.43 ± 0.12
<i>A. tenuissima</i> MAP06	12.21 ± 0.04	10.91 ± 0.23
<i>A. tenuissima</i> MAP07	11.02 ± 0.11	11.03 ± 0.02
<i>A. tenuissima</i> MAP09	11.38 ± 0.07	12.89 ± 0.07
<i>A. tenuissima</i> MAP10	11.45 ± 0.16	13.31 ± 0.19
<i>Aspergillus ochraceus</i> MUCL 14207	— <sup>a</sup>	14.21 ± 0.03
<i>Fusarium oxysporum</i> CECT 2866	—	13.11 ± 0.33
<i>Penicillium expansum</i> CECT 2278	—	11.43 ± 0.12
<i>Rhizopus stolonifer</i> CECT 2344	—	13.48 ± 0.09
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—	11.07 ± 0.11
<i>Escherichia coli</i>	—	—
Oats	—	12.83 ± 0.12
Soya	—	14.04 ± 0.03
Tomato	—	12.04 ± 0.09
Barley	—	11.39 ± 0.03
Almond	—	11.23 ± 0.19
Pistachio	—	12.02 ± 0.04
Carrot	—	11.38 ± 0.11
Apple	—	12.09 ± 0.23
Strawberry	—	13.78 ± 0.05
Pepper	—	11.60 ± 0.13
Hazelnut	—	14.11 ± 0.15
Goat	—	12.02 ± 0.11
Hake	—	14.14 ± 0.07
Chicken	—	12.29 ± 0.03

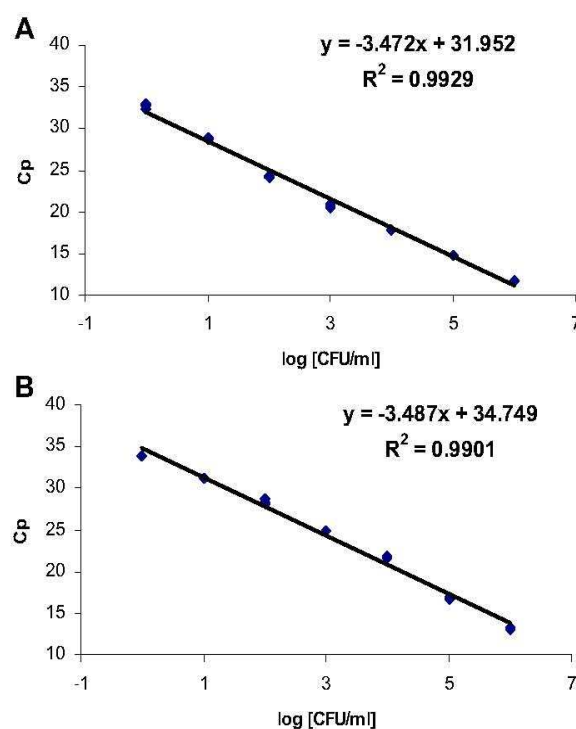
<sup>a</sup> Indicates no positive signal after 45 PCR cycles.

Cp values between 10.98 and 12.82, while no positive amplification signal was obtained after 45 cycles on the non-target fungal, bacterial, yeast, animal and plant species tested. The 18S rRNA eukaryotic system amplified the specific DNA fragment from all eukaryotic species tested with Cp values in the range of 10.91–14.67.

#### 3.2. Standard curves and amplification efficiency

To determine the sensitivity of the real-time PCR system developed, standard curves relating Cp values and the logarithm of *Alternaria* counts were generated using an *A. alternata* viable culture (Fig. 1A) and the same culture heated at 90 °C for 5 min (Fig. 1B). The results revealed a good linear relationship ( $R^2 > 0.99$ ) between the log of *A. alternata* counts and the crossing point values. Linearity was observed over the range between 1 and  $1 \times 10^6$  CFU/ml ( $3 \times 10^{-3}$  to  $3 \times 10^3$  ng DNA per reaction). The sensitivity (lowest *Alternaria* counts detected) of the real-time PCR system was 1 CFU/ml (3 pg DNA per reaction). Similar detection limits were reported by other authors using real-time PCR methods for *Alternaria* spp. Andersen et al. (2006) developed a SYBR Green real-time PCR based on the AM-toxin gene for the detection of *Alternaria* spp. DNA in apple samples that was able to detect 4 pg of *Alternaria* spp. DNA. Similarly, Guillemette y col. (2004) developed a SYBR Green real-time PCR based on the nonribosomal peptide synthase (NRPS) and the ATP-binding cassette (ABC) transporter genes, capable to detect 3.5 pg of *Alternaria brassicae* DNA in cruciferous seed samples. The real-time PCR assay described herein improved 100-fold the sensitivity of conventional PCR techniques previously described, which detection limits were  $10^2$  CFU/ml (Pavón et al., 2010, 2011).

The amplification efficiency was determined by the slope of the standard curve. The slopes of the linear equations were  $-3.47$  for



**Fig. 1.** Standard curves obtained with DNA isolated from 10-fold dilutions of a *A. alternata* viable culture (A) and from the same culture heated at 90 °C/5 min (B), showing the correlation between de Cp values obtained in the *Alternaria*-specific real-time PCR and the logarithm of *Alternaria* counts.



*A. alternata* viable culture (Fig. 1A) and  $-3.49$  for culture heated at  $90^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$  (Fig. 1B), which corresponded to amplification efficiencies of 94% and 93.6%, respectively. Efficiencies for an optimal real-time PCR should be between 90% and 105%. Lower reaction efficiencies may be caused by poor primer design or suboptimal amplification conditions. Reaction efficiencies  $>100\%$  may indicate pipetting errors or contaminations (Dorak, 2006; González-Salgado et al., 2009). The coefficients of variation (CV) of the crossing point (Cp) values obtained in triplicate assays from 3 independent real-time PCR experiments were lower than 1%, for both viable and heated culture dilutions.

To test the efficiency of the method under practical conditions, tomato pulp samples (0.9 ml) were inoculated with 0.1 ml of *A. alternata* culture (either before or after heat treatment) containing  $10^6$ – $10^1$  CFU/ml. CVs of Cp values for tomato pulp inoculated with viable culture were in the range of 0.19–0.85%. Moreover, even lower CVs were obtained for tomato pulp inoculated with heated culture (0.10–0.54%). The low CV values obtained in the real-time PCR assay revealed high reproducibility to quantify *Alternaria* spp. in contaminated tomato pulp. The standard curves shown good linear relationships between the log of *A. alternata* loads and the crossing point values over the range  $1$ – $10^5$  CFU/ml, with  $R^2$  values of 0.993 (Fig. 2A) and 0.9927 (Fig. 2B) for the tomato pulp inoculated with viable and heat treated culture, respectively. In addition, one-way analysis of variance (ANOVA) was used to look for significant differences between the Cp values from both standard curves. There were no significant differences ( $P < 0.0001$ ) between the Cp values obtained for each *Alternaria* concentration. Thus, a new standard curve was generated ( $R^2 = 0.987$ ) pooling together the data from tomato pulp inoculated with viable and with heat treated culture (Fig. 2C).

### 3.3. Analysis of commercial samples

The applicability of the method developed for detection and quantification of DNA from *Alternaria* spp. in foodstuffs was assessed through analysis of raw and processed fruits and vegetables. Eighty samples of fresh fruits and vegetables were analyzed, 44 of which (24 tomatoes, 10 strawberries, 5 carrots, and 5 apples) showed some evidence of spoilage, probably associated with mold activity (Table 2). The real-time PCR analysis demonstrated the presence of *Alternaria* spp. DNA in 46 out of the 80 raw samples analyzed (57.5%). *Alternaria* counts were determined by plating in PCA, because *Alternaria* sporulates well on this media and the genus identification can be carried out more easily (Sorensen et al., 2009). At the genus level, the most dominant genus was *Alternaria*, followed by other genus like *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium* or *Cladosporium*, usually isolated together with *Alternaria* in apples, carrots, strawberries and tomatoes (Ellis and Ellis, 1997; Andersen and Frisvad, 2004). On the other hand, estimated *Alternaria* counts were obtained by substitution of the Cps in the standard curve equation. *Alternaria* growth was not detected in PCA from any of the unspoiled samples analysed, with the exception of unspoiled strawberry TA195 sample, where *Alternaria* counts were 10 CFU/g. However, *Alternaria* DNA was detected in 3 out of 10 unspoiled carrot samples, and 1 out of 5 unspoiled strawberry samples, with Cp values between 29.67 and 32.74, indicating low *Alternaria* spp. contamination levels in the unspoiled samples (2–15 CFU/g). Neither *Alternaria* spp. DNA nor *Alternaria* colonies were detected in unspoiled apples. On the contrary, high incidence of *Alternaria* spp. DNA was found in the spoiled samples analysed, where 9 out of 10 strawberry samples (90%), 4 out of 5 apple samples (80%), and all carrot and tomato samples were positive by real-time PCR, with Cp values between 15.72 and 32.05. *Alternaria* counts in PCA of spoiled samples that tested positive by real-time PCR were between 10 and  $6 \times 10^4$  CFU/g, with the exception of three carrot samples, which contained lower amounts of *Alternaria* DNA. The estimated

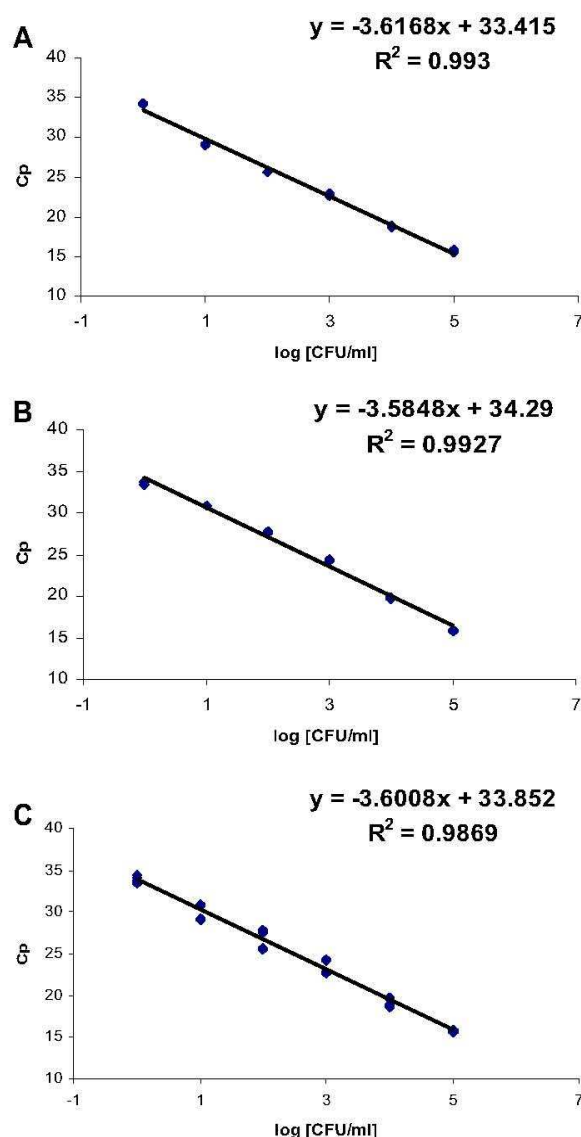


Fig. 2. Standard curves obtained with DNA isolated from tomato pulp inoculated with dilutions of a *A. alternata* viable culture (A) and with culture heated at  $90^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$  (B), showing the correlation between de Cp values obtained in the *Alternaria*-specific real-time PCR and the logarithm of *Alternaria* counts. Representative standard curve generated using the data from tomato pulp inoculated with viable and heat treated culture (C).

*Alternaria* counts were plotted against the *Alternaria* counts obtained by plating on PCA (Fig. 3A), showing a significant correlation ( $R^2 = 0.9006$ ,  $P < 0.01$ ). These differences can be due to experimental errors during sample treatment or incorrect fungal identification by conventional methods.

Regarding processed foodstuffs, *Alternaria* spp. DNA was detected by real-time PCR analysis in 47 out of 90 tomato products (52.2%) and in 19 out of 20 dried pepper samples (95%) (Table 3). Thirty-eight sun-dried tomato samples were analysed, 28 of which (73.7%) tested positive in the analysis of *Alternaria* DNA. As in the case in the raw samples, a significant correlation ( $R^2 = 0.9778$ ,  $P < 0.01$ ) was obtained between the estimated *Alternaria* counts and the counts obtained by plating on PCA (Fig. 3B). The high *Alternaria* counts obtained in many sun-dried tomato and dried

Table 2

Cp values (mean and standard deviation) obtained in the real-time PCR *Alternaria*-specific system from raw fruit and vegetable samples.

Type of product (No samples)	<i>Alternaria</i> spp. PCR system	18S rRNA PCR system	<i>Alternaria</i> counts estimated	<i>Alternaria</i> counts PCA
Unspoiled tomatoes (16) <sup>b</sup>	— <sup>a</sup>	14.47 ± 0.14	—	—
Spoiled tomato TA090	19.58 ± 0.26	16.79 ± 0.05	9.2 × 10 <sup>3</sup>	7 × 10 <sup>3</sup>
Spoiled tomato TA091	19.59 ± 0.23	15.70 ± 0.15	9.1 × 10 <sup>3</sup>	6 × 10 <sup>3</sup>
Spoiled tomato TA092	19.63 ± 0.09	14.21 ± 0.24	8.9 × 10 <sup>3</sup>	6 × 10 <sup>3</sup>
Spoiled tomato TA093	19.50 ± 0.22	13.09 ± 0.26	9.7 × 10 <sup>3</sup>	8 × 10 <sup>3</sup>
Spoiled tomato TA113	23.25 ± 0.19	13.98 ± 0.09	8.8 × 10 <sup>2</sup>	1 × 10 <sup>3</sup>
Spoiled tomato TA114	17.05 ± 0.25	15.86 ± 0.07	4.6 × 10 <sup>4</sup>	2 × 10 <sup>4</sup>
Spoiled tomato TA115	15.72 ± 0.12	15.29 ± 0.15	1.1 × 10 <sup>3</sup>	5 × 10 <sup>4</sup>
Spoiled tomato TA116	16.14 ± 0.09	16.40 ± 0.09	8.3 × 10 <sup>4</sup>	5 × 10 <sup>4</sup>
Spoiled tomato TA117	18.79 ± 0.07	14.88 ± 0.04	1.5 × 10 <sup>4</sup>	9 × 10 <sup>3</sup>
Spoiled tomato TA118	16.79 ± 0.02	15.06 ± 0.11	5.5 × 10 <sup>4</sup>	4 × 10 <sup>4</sup>
Spoiled tomato TA119	16.96 ± 0.16	17.38 ± 0.27	4.9 × 10 <sup>4</sup>	5 × 10 <sup>4</sup>
Spoiled tomato TA120	16.52 ± 0.12	13.58 ± 0.18	6.5 × 10 <sup>4</sup>	6 × 10 <sup>4</sup>
Spoiled tomato TA121	16.81 ± 0.19	16.15 ± 0.16	5.4 × 10 <sup>4</sup>	5 × 10 <sup>4</sup>
Spoiled tomato TA122	16.32 ± 0.28	14.14 ± 0.20	7.4 × 10 <sup>4</sup>	5 × 10 <sup>4</sup>
Spoiled tomato TA123	17.57 ± 0.07	17.20 ± 0.07	3.3 × 10 <sup>4</sup>	2 × 10 <sup>4</sup>
Spoiled tomato TA136	17.47 ± 0.12	16.04 ± 0.05	3.5 × 10 <sup>4</sup>	2 × 10 <sup>4</sup>
Spoiled tomato TA137	22.32 ± 0.03	15.21 ± 0.29	1.6 × 10 <sup>3</sup>	2 × 10 <sup>3</sup>
Spoiled tomato TA138	21.37 ± 0.21	13.62 ± 0.20	2.9 × 10 <sup>3</sup>	2 × 10 <sup>3</sup>
Spoiled tomato TA139	23.88 ± 0.09	15.66 ± 0.16	5.9 × 10 <sup>2</sup>	6 × 10 <sup>2</sup>
Spoiled tomato TA140	24.66 ± 0.18	16.80 ± 0.23	3.6 × 10 <sup>2</sup>	6 × 10 <sup>2</sup>
Spoiled tomato TA141	18.83 ± 0.02	14.09 ± 0.25	1.5 × 10 <sup>4</sup>	9 × 10 <sup>3</sup>
Spoiled tomato TA142	20.81 ± 0.17	17.06 ± 0.03	4.2 × 10 <sup>3</sup>	5 × 10 <sup>3</sup>
Spoiled tomato TA143	24.81 ± 0.15	15.36 ± 0.08	3.2 × 10 <sup>2</sup>	3 × 10 <sup>2</sup>
Spoiled tomato TA144	19.53 ± 0.22	17.36 ± 0.16	9.5 × 10 <sup>3</sup>	6 × 10 <sup>3</sup>
Unspoiled carrots (7) <sup>c</sup>	—	14.06 ± 0.21	—	—
Unspoiled carrot TA187	29.67 ± 0.08	13.18 ± 0.13	15	—
Unspoiled carrot TA188	32.74 ± 0.22	17.28 ± 0.03	2	—
Unspoiled carrot TA190	31.76 ± 0.06	16.24 ± 0.05	4	—
Spoiled carrot TA218	31.23 ± 0.17	14.12 ± 0.30	5	—
Spoiled carrot TA219	27.98 ± 0.09	13.53 ± 0.25	43	10
Spoiled carrot TA220	30.27 ± 0.03	14.44 ± 0.16	10	—
Spoiled carrot TA221	25.45 ± 0.12	13.29 ± 0.02	2.2 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>2</sup>
Spoiled carrot TA222	31.88 ± 0.16	13.84 ± 0.17	4	—
Unspoiled strawberries (4) <sup>d</sup>	—	13.87 ± 0.19	—	—
Unspoiled strawberry TA195	30.68 ± 0.08	12.09 ± 0.02	8	10
Spoiled strawberry TA203	32.05 ± 0.12	17.28 ± 0.27	3	10
Spoiled strawberry TA204	24.75 ± 0.23	17.70 ± 0.17	3.4 × 10 <sup>2</sup>	3 × 10 <sup>2</sup>
Spoiled strawberry TA205	25.46 ± 0.09	15.24 ± 0.05	2.1 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>2</sup>
Spoiled strawberry TA206	25.48 ± 0.13	16.21 ± 0.09	2.1 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>2</sup>
Spoiled strawberry TA207	25.75 ± 0.20	15.62 ± 0.20	1.8 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>2</sup>
Spoiled strawberry TA208	25.79 ± 0.02	15.61 ± 0.16	1.7 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>2</sup>
Spoiled strawberry TA209	25.30 ± 0.19	16.50 ± 0.23	2.4 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>2</sup>
Spoiled strawberry TA210	25.70 ± 0.15	16.09 ± 0.25	1.8 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>2</sup>
Spoiled strawberry TA211	24.70 ± 0.24	16.96 ± 0.03	3.5 × 10 <sup>2</sup>	3 × 10 <sup>2</sup>
Spoiled strawberry TA212	—	14.36 ± 0.33	—	—
Unspoiled apples (5) <sup>e</sup>	—	15.43 ± 0.16	—	—
Spoiled apple TA213	26.40 ± 0.13	13.84 ± 0.07	1.2 × 10 <sup>2</sup>	3 × 10 <sup>2</sup>
Spoiled apple TA214	26.64 ± 0.09	12.24 ± 0.18	1.0 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>2</sup>
Spoiled apple TA215	—	14.22 ± 0.09	—	—
Spoiled apple TA216	29.50 ± 0.02	12.09 ± 0.22	16	1 × 10 <sup>2</sup>
Spoiled apple TA217	28.20 ± 0.18	15.22 ± 0.14	37	1 × 10 <sup>2</sup>

<sup>a</sup> Indicates no positive signal after 45 PCR cycles.

<sup>b</sup> Unspoiled tomatoes: TA028, TA029, TA094, TA095, TA111, TA112, TA172, TA173, TA174, TA175, TA176, TA177, TA178, TA179, TA180 and TA181.

<sup>c</sup> Unspoiled carrots: TA183, TA184, TA185, TA186, TA189, TA191 and TA192.

<sup>d</sup> Unspoiled strawberries: TA193, TA194, TA196 and TA197.

<sup>e</sup> Unspoiled apples: TA198, TA199, TA200, TA201 and TA202.

pepper samples could be due to the drying process, particularly during the early stages, when the environmental conditions are appropriate for *Alternaria* growth. With respect to the heat treated products, the mold counts were negative in all the samples analysed. However, in 3 out of 13 (23.1%) canned tomato products, 7 out of 13 (53.8%) ketchup, and 9 out of 26 (34.6%) tomato sauces, *Alternaria* DNA was demonstrated by real-time PCR. It should be noted that two canned tomato products (TA035 and TA062) and

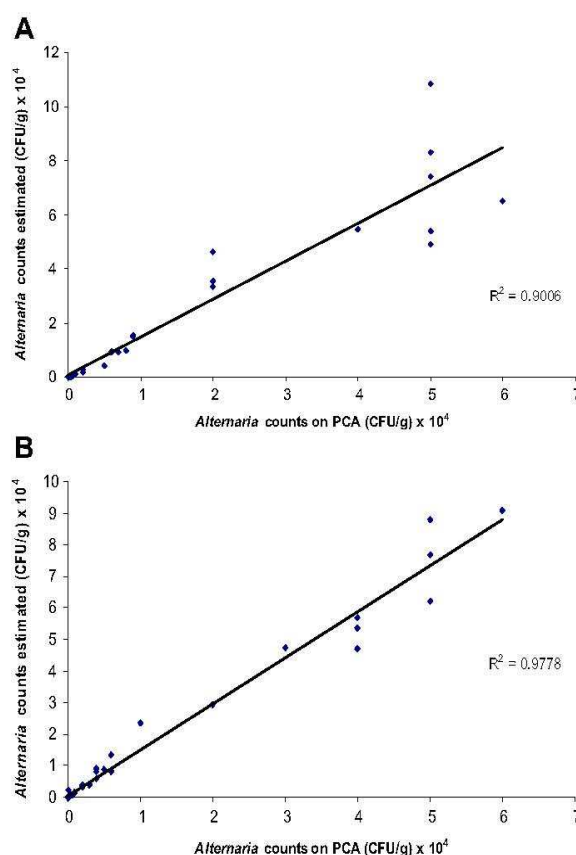


Fig. 3. Relationship between *Alternaria* counts estimated using the *Alternaria* spp. Real-time PCR system, and the counts obtained by plating on PCA from commercial raw samples (A) and processed foodstuffs (B).

four ketchup samples (TA068, TA074, TA075 and TA077) showed Cp values lower than 17, indicating *Alternaria* estimated counts higher than  $1 \times 10^4$  CFU/g. The presence of high amounts of *Alternaria* DNA in these samples can indicate the use of low quality raw materials, and also the potential presence of *Alternaria* mycotoxins in the final products that should be analysed further.

A common problem of PCR-based methods for food analysis is failure of DNA amplification due to the presence of inhibitory substances in the samples or to DNA shearing. Thus, it is essential to include positive controls in order to avoid false-negative results. The absence of the control product would indicate a technical problem in the process and would avoid false-negative results (Zur et al., 2002). For this reason, a positive amplification control was performed in each real-time PCR experiment by using 18Sfweu and 18Srveu primers and 18STM Taqman probe. This PCR system successfully amplified a conserved fragment on the 18S rRNA gene in all the food samples analyzed. These results confirm that the food samples appearing negative in the *Alternaria*-specific PCR assay did not correspond to false-negative results.

Detection of *Alternaria* spp. in raw and processed foodstuffs is important for food safety, because they produce mycotoxins that can withstand food processing. Our results are in agreement with previous studies reporting the presence of toxigenic *Alternaria* strains in black mold of tomato, producing substantial losses, especially in tomatoes for canning (Terminiello et al., 2006; Ostry, 2008; Logrieco et al., 2009; Pavón et al., 2010, 2011; Pose et al., 2010). Jackson and Al-Taher (2008) reported the occurrence of *Alternaria* mycotoxins in spoiled apples affected by mouldy core-rot.



Other studies, found that *A. radicina* and *Alternaria dauci* are the most important seed-borne pathogens on carrots, causing black rot of roots and leaf blight, respectively (Tylkowska, 1992; Konstantinova et al., 2002; Solfrizzo et al., 2004). Moreover, black rot infection of *A. alternata* occurs on pepper fruits when they are over-

**Table 3**

Cp values (mean and standard deviation) obtained in the real-time PCR *Alternaria*-specific system from commercial processed fruit and vegetable samples.

Type of product (No samples)	<i>Alternaria</i> spp. PCR system	18S rRNA PCR system	<i>Alternaria</i> counts estimated (CFU/g)	<i>Alternaria</i> counts PCA (CFU/g)
Sun-dried tomatoes (10) <sup>b</sup>	— <sup>a</sup>	15.07 ± 0.14	—	—
Sun-dried tomato TA030	16.05 ± 0.14	12.74 ± 0.15	8.8 × 10 <sup>4</sup>	5 × 10 <sup>4</sup>
Sun-dried tomato TA031	16.26 ± 0.22	16.70 ± 0.20	7.7 × 10 <sup>4</sup>	5 × 10 <sup>4</sup>
Sun-dried tomato TA072	16.82 ± 0.09	12.79 ± 0.13	5.4 × 10 <sup>4</sup>	4 × 10 <sup>4</sup>
Sun-dried tomato TA073	16.73 ± 0.06	17.50 ± 0.09	5.7 × 10 <sup>4</sup>	4 × 10 <sup>4</sup>
Sun-dried tomato TA096	19.01 ± 0.11	16.75 ± 0.02	1.3 × 10 <sup>4</sup>	6 × 10 <sup>3</sup>
Sun-dried tomato TA097	23.63 ± 0.04	12.78 ± 0.07	6.9 × 10 <sup>2</sup>	5 × 10 <sup>2</sup>
Sun-dried tomato TA098	19.62 ± 0.23	16.08 ± 0.09	9.0 × 10 <sup>3</sup>	5 × 10 <sup>3</sup>
Sun-dried tomato TA099	23.69 ± 0.08	16.00 ± 0.18	6.6 × 10 <sup>2</sup>	6 × 10 <sup>2</sup>
Sun-dried tomato TA100	23.57 ± 0.27	13.03 ± 0.15	7.2 × 10 <sup>2</sup>	5 × 10 <sup>2</sup>
Sun-dried tomato TA101	19.69 ± 0.14	14.92 ± 0.22	8.6 × 10 <sup>3</sup>	6 × 10 <sup>3</sup>
Sun-dried tomato TA102	23.69 ± 0.06	12.26 ± 0.08	6.6 × 10 <sup>2</sup>	5 × 10 <sup>2</sup>
Sun-dried tomato TA103	22.62 ± 0.13	16.45 ± 0.18	1.3 × 10 <sup>3</sup>	1 × 10 <sup>3</sup>
Sun-dried tomato TA104	30.73 ± 0.08	13.69 ± 0.14	7	—
Sun-dried tomato TA105	29.76 ± 0.07	12.81 ± 0.24	14	—
Sun-dried tomato TA123	19.75 ± 0.04	13.14 ± 0.07	8.2 × 10 <sup>3</sup>	4 × 10 <sup>3</sup>
Sun-dried tomato TA124	19.59 ± 0.12	12.24 ± 0.08	9.1 × 10 <sup>3</sup>	4 × 10 <sup>3</sup>
Sun-dried tomato TA125	21.16 ± 0.23	14.22 ± 0.10	3.3 × 10 <sup>3</sup>	2 × 10 <sup>3</sup>
Sun-dried tomato TA126	20.90 ± 0.14	12.09 ± 0.12	4.0 × 10 <sup>3</sup>	2 × 10 <sup>3</sup>
Sun-dried tomato TA127	20.25 ± 0.15	12.22 ± 0.14	6.0 × 10 <sup>3</sup>	4 × 10 <sup>3</sup>
Sun-dried tomato TA128	19.75 ± 0.28	13.17 ± 0.23	8.2 × 10 <sup>3</sup>	6 × 10 <sup>3</sup>
Sun-dried tomato TA129	32.71 ± 0.23	17.28 ± 0.08	2	—
Sun-dried tomato TA130	32.23 ± 0.14	17.70 ± 0.27	3	—
Sun-dried tomato TA131	31.21 ± 0.12	16.24 ± 0.15	5	—
Sun-dried tomato TA145	27.18 ± 0.09	16.50 ± 0.23	71	1 × 10 <sup>2</sup>
Sun-dried tomato TA147	31.60 ± 0.04	16.96 ± 0.23	4	10
Sun-dried tomato TA149	30.50 ± 0.16	14.36 ± 0.16	9	10
Sun-dried tomato TA151	31.85 ± 0.24	13.84 ± 0.07	4	—
Sun-dried tomato TA152	32.16 ± 0.33	12.84 ± 0.08	3	—
Dried pepper TA153	31.18 ± 0.09	15.36 ± 0.08	6	10
Dried pepper TA153	30.85 ± 0.12	17.36 ± 0.16	7	10
Dried pepper TA155	—	12.10 ± 0.17	—	—
Dried pepper TA156	29.53 ± 0.23	13.07 ± 0.02	16	50
Dried pepper TA157	22.81 ± 0.09	15.74 ± 0.26	1.2 × 10 <sup>3</sup>	1 × 10 <sup>3</sup>
Dried pepper TA158	27.52 ± 0.11	15.06 ± 0.11	57	100
Dried pepper TA159	26.96 ± 0.02	13.18 ± 0.23	82	100
Dried pepper TA160	22.38 ± 0.28	17.28 ± 0.17	1.5 × 10 <sup>3</sup>	1 × 10 <sup>3</sup>
Dried pepper TA161	27.21 ± 0.18	17.70 ± 0.07	70	100
Dried pepper TA162	32.21 ± 0.03	16.24 ± 0.05	3	—
Dried pepper TA163	16.59 ± 0.12	16.21 ± 0.09	6.2 × 10 <sup>4</sup>	5 × 10 <sup>4</sup>
Dried pepper TA164	20.96 ± 0.07	15.62 ± 0.20	3.8 × 10 <sup>3</sup>	3 × 10 <sup>3</sup>
Dried pepper TA165	21.65 ± 0.20	15.61 ± 0.26	2.4 × 10 <sup>3</sup>	1 × 10 <sup>2</sup>
Dried pepper TA166	16.00 ± 0.02	16.50 ± 0.23	9.1 × 10 <sup>4</sup>	6 × 10 <sup>4</sup>
Dried pepper TA167	17.77 ± 0.17	16.09 ± 0.25	2.9 × 10 <sup>4</sup>	2 × 10 <sup>4</sup>
Dried pepper TA168	17.03 ± 0.22	16.96 ± 0.03	4.7 × 10 <sup>4</sup>	4 × 10 <sup>4</sup>
Dried pepper TA169	18.12 ± 0.09	12.26 ± 0.33	2.3 × 10 <sup>4</sup>	1 × 10 <sup>4</sup>
Dried pepper TA170	17.02 ± 0.11	14.06 ± 0.26	4.7 × 10 <sup>4</sup>	3 × 10 <sup>4</sup>
Dried pepper TA171	20.77 ± 0.23	17.02 ± 0.13	4.3 × 10 <sup>3</sup>	3 × 10 <sup>3</sup>
Dried pepper TA172	17.76 ± 0.19	13.84 ± 0.17	2.9 × 10 <sup>4</sup>	2 × 10 <sup>4</sup>
Canned tomatoes (10) <sup>c</sup>	—	14.85 ± 0.14	—	—
Canned tomato TA035	16.54 ± 0.07	13.07 ± 0.02	6.4 × 10 <sup>4</sup>	—
Canned tomato TA052	31.62 ± 0.12	15.74 ± 0.26	4	—
Canned tomato TA062	15.83 ± 0.09	15.19 ± 0.04	1.0 × 10 <sup>5</sup>	—
Ketchup (6) <sup>d</sup>	—	13.82 ± 0.20	—	—
Ketchup TA040	31.58 ± 0.18	13.35 ± 0.02	4	—
Ketchup TA068	15.94 ± 0.29	16.44 ± 0.12	9.4 × 10 <sup>4</sup>	—
Ketchup TA074	16.68 ± 0.18	13.70 ± 0.16	5.9 × 10 <sup>4</sup>	—
Ketchup TA075	16.73 ± 0.20	16.23 ± 0.09	5.7 × 10 <sup>4</sup>	—
Ketchup TA077	16.62 ± 0.09	14.38 ± 0.06	6.1 × 10 <sup>4</sup>	—
Ketchup TA078	19.19 ± 0.10	13.20 ± 0.08	1.2 × 10 <sup>4</sup>	—
Ketchup TA079	19.37 ± 0.08	12.19 ± 0.10	1.1 × 10 <sup>4</sup>	—
Tomato sauce (17) <sup>e</sup>	—	15.30 ± 0.17	—	—
Tomato sauce TA042	32.24 ± 0.09	13.92 ± 0.07	3	—

**Table 3 (continued)**

Type of product (No samples)	<i>Alternaria</i> spp. PCR system	18S rRNA PCR system	<i>Alternaria</i> counts estimated (CFU/g)	<i>Alternaria</i> counts PCA (CFU/g)
Tomato sauce TA044	15.99 ± 0.17	12.21 ± 0.29	9.1 × 10 <sup>4</sup>	—
Tomato sauce TA046	15.94 ± 0.07	15.23 ± 0.16	9.4 × 10 <sup>4</sup>	—
Tomato sauce TA047	16.04 ± 0.09	15.70 ± 0.23	8.8 × 10 <sup>4</sup>	—
Tomato sauce TA050	16.46 ± 0.06	15.36 ± 0.08	6.8 × 10 <sup>4</sup>	—
Tomato sauce TA059	31.87 ± 0.03	14.22 ± 0.90	4	—
Tomato sauce TA060	16.56 ± 0.18	12.09 ± 0.32	6.3 × 10 <sup>4</sup>	—
Tomato sauce TA109	19.28 ± 0.22	14.09 ± 0.25	1.1 × 10 <sup>4</sup>	—
Tomato sauce TA110	19.09 ± 0.31	17.06 ± 0.03	1.3 × 10 <sup>4</sup>	—

<sup>a</sup> Indicates no positive signal after 45 PCR cycles.

<sup>b</sup> Sun-dried tomatoes: TA056, TA057, TA058, TA071, TA132, TA133, TA134, TA146, TA148 and TA150.

<sup>c</sup> Canned tomatoes: TA032, TA033, TA034, TA053, TA063, TA065, TA066, TA086, TA087 and TA108.

<sup>d</sup> Ketchup: TA036, TA037, TA038, TA039, TA069 and TA076.

<sup>e</sup> Tomato sauce: TA043, TA045, TA048, TA049, TA051, TA061, TA067, TA080, TA081, TA082, TA083, TA084, TA085, TA088, TA089, TA106 and TA107.

ripened or injured by sunlight, and the presence of *Alternaria* mycotoxins was reported by Bottalico and Logrieco (1998) in samples of peppers with black spot. Finally, Giry and Szteke (1995) reported the presence of AOH in strawberry samples. Many samples analysed in the above-mentioned studies were spoiled fruits with mouldy diseases, and their direct consumption is not probable. However, mouldy-core rot fruits containing *Alternaria* and their toxins could be used in the production of manufactured products like juices, sauces or preserves and, therefore, high levels of toxins could occur in the commercial processed products (Barkai-Golan and Paster, 2008). Chemical analysis to detect *Alternaria* mycotoxins in foodstuffs is cumbersome and expensive, while the PCR methods are cheaper and can be performed in a working day, allowing retrieval of suspected products. A positive correlation has been previously found between the PCR detection of fungal DNA and the presence of mycotoxins in food samples (Andersen and Frisvad, 2004; Sarlin et al., 2006; Pasquali et al., 2010; Pose et al., 2010).

The real-time PCR assay developed in this work is a rapid, specific and sensitive technique to detect and quantify *Alternaria* spp. DNA in raw and processed commodities frequently contaminated with this genus, such as tomato, carrots, peppers, strawberry and apples. Accordingly, this real-time PCR-based assay provides a useful tool for early detection of *Alternaria* spp. and could be applied as a quality and biosecurity marker of raw materials and final products in the fruits and vegetables processing industries.

## Acknowledgements

This study was supported by Grant No. AGL 2006-07659 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the Programa de Vigilancia Sanitaria 2009/AGR-1489 from the Comunidad de Madrid (Spain). Miguel Ángel Pavón is recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

## References

- Andersen, B., Frisvad, J., 2004. Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7507–7513.
- Andersen, B., Smedsgaard, J., Jørring, I., Skouboe, P., Pedersen, L.H., 2006. Real-time PCR quantification of the AM-toxin gene and HPLC qualification of toxigenic metabolites from *Alternaria* species from apples. *International Journal of Food Microbiology* 111, 105–111.
- Barkai-Golan, R., 2001. *Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: Development and Control*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Barkai-Golan, R., Paster, N., 2008. Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 1. *World Mycotoxin Journal* 1, 147–159.

- Bottalico, A., Logrieco, A., 1998. Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. In: Sinha, K.K., Bhatnager, D. (Eds.), *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Marcel Dekker, New York, pp. 65–108.
- Bustin, S., Benes, V., Garson, J., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M., Shipley, G., Vandesompele, J., Wittwer, C., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55, 611–622.
- Chou, H., Wu, W., 2002. Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. *Mycological Research* 106, 164–169.
- Dorak, M.T., 2006. Real-time PCR. BIOS Advanced Methods Series. Taylor & Francis Group, London.
- Ellis, M.B., Ellis, J.P., 1997. *Microfungi on Land Plants. An Identification Handbook, Enlarged Edition*. The Richmond Publishing Co. Ltd, Engalnd.
- Gil-Serna, J., González-Salgado, A., González-Jaén, M.T., Vázquez, C., Patiño, B., 2009. ITS-based detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* in grapes and green coffee beans by real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 131, 162–167.
- Giry, H., Szteke, B., 1995. Determination of *Alternaria* mycotoxins in selected raw and processed fruit and vegetable products. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 46, 129–133.
- González-Salgado, A., Patiño, B., Gil-Serna, J., Vázquez, C., González-Jaén, M.T., 2009. Specific detection of *Aspergillus carbonarius* by SYBR® Green and TaqMan® quantitative PCR assays based on the multicopy ITS2 region of the rRNA gene. *FEMS Microbiology Letters* 295, 57–66.
- Guillemette, T., Iacomini, B., Simoneau, P., 2004. Conventional and real-time PCR-based assay for detecting pathogenic *Alternaria brassicae* in cruciferous seed. *Plant Disease* 88, 490–496.
- Hong, S.G., Cramer, R.A., Lawrence, C.B., Pryor, B.M., 2005. Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genetics and Biology* 42, 119–129.
- Jackson, L.S., Al-Tajer, F., 2008. Factors affecting mycotoxin production in fruits. In: Barkai-Golan, R., Paster, N. (Eds.), *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Elsevier Scientific Publishers, San Diego, CA, USA, pp. 75–104.
- Konstantinova, P., Bonants, P., van Gent-Pelzer, M., van der Zouwen, P., van den Bula, R., 2002. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. *Mycological Research* 106, 23–33.
- Liu, G., Qian, Y., Zhang, P., Dong, W., Qi, Y., Guo, H., 1992. Etiological role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer. *Chinese Medical Journal* 105, 394–400.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mule, M., Moretti, A., Perrone, G., 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology* 109, 645–667.
- Logrieco, A., Moretti, A., Solfrizzo, M., 2009. *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal* 2, 129–140.
- Martin, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Pegels, N., Hernández, P.E., Martín, R., 2009. SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. *Meat Science* 82, 252–259.
- Ostry, V., 2008. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal* 1, 175–188.
- Pasquali, M., Giraud, F., Brochot, C., Cocco, E., Hoffmann, L., Bohn, T., 2010. Genetic *Fusarium* chemotyping as a useful tool for predicting nivalenol contamination in winter wheat. *International Journal of Food Microbiology* 137, 246–253.
- Pavón, M.A., González, I., Pegels, N., Martín, R., García, T., 2010. PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a 1. *Food Control* 21, 1745–1756.
- Pavón, M.A., González, I., Rojas, M., Pegels, N., Martín, R., García, T., 2011. PCR detection of *Alternaria* spp. in processed foods, based on the internal transcribed spacer genetic marker. *Journal of Food Protection* 74, 240–247.
- Pose, G., Patriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A., Fernández, V., 2010. Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *International Journal of Food Microbiology* 142, 348–353.
- Pozzi, C.R., Braghini, R., Arcaro, J., Zorzete, P., Israel, A.L., Pozar, I.O., Denucci, S., Correa, B., 2005. Mycoflora and occurrence of alternariol and alternariol monomethyl ether in Brazilian sunflower from sowing to harvest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 5824–5828.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., 2004. In: *Introduction to Food-and Airborne Fungi*, sixth ed. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht.
- Sarlin, T., Yli-Mattila, T., Jestoi, M., Rizzo, A., Paavonen-Huhtala, S., Haikara, A., 2006. Real-time PCR for quantification of toxigenic *Fusarium* species in barley and malt. *European Journal of Plant Pathology* 114, 371–380.
- Serdani, M., Kang, J., Andersen, B., Crous, P., 2002. Characterisation of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycological Research* 106, 561–569.
- Simmons, E.G., 2007. *Alternaria. An Identification Manual*. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht.
- Solfrizzo, M., de Girolamo, A., Vitti, C., Tylkowska, K., Grabarkiewicz-Szczesna, J., Szopinska, D., Dorna, H., 2005. Toxigenic profile of *Alternaria alternata* and *Alternaria radicina* occurring on umbelliferous plants. *Food Additives and Contaminants* 22, 302–308.
- Solfrizzo, M., de Girolamo, A., Vitti, C., Visconti, A., van den Bulk, R., 2004. Liquid chromatographic determination of *Alternaria* toxins in carrot. *Journal of AOAC International* 87, 101–106.
- Sorensen, J.L., Mogensen, J.M., Thrane, U., Andersen, B., 2009. Potato carrot agar with manganese as an isolation medium for *Alternaria*, *Epicoccum* and *Phoma*. *International Journal of Food Microbiology* 130, 22–26.
- Suarez, M.B., Walsh, K., Boonham, N., O'Neill, T., Pearson, S., Barker, I., 2005. Development of real-time PCR (TaqMan®) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 890–899.
- Terminiello, L., Patriarca, A., Pose, G., Fernández, V., 2006. Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean tomato puree. *Mycotoxin Research* 22, 236–240.
- Tylkowska, K., 1992. Carrot seed-borne diseases caused by *Alternaria* species. In: Chelkowski, J., Visconti, A. (Eds.), *Alternaria: Biology, Plant Diseases and Metabolites*. Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam, pp. 337–352.
- Zur, G., Shimon, E.M., Hallerman, E., Kashi, Y., 2002. Detection of *Alternaria* fungal contamination in cereal grains by a polymerase chain reaction-based assay. *Journal of Food Protection* 65, 1433–1440.







Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Food Control

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)

# A real-time reverse-transcriptase PCR technique for detection and quantification of viable *Alternaria* spp. in foodstuffs

Miguel Ángel Pavón, Isabel González, Rosario Martín, Teresa García\*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 12 March 2012

Received in revised form

9 May 2012

Accepted 11 May 2012

## Keywords:

Real-time reverse-transcriptase PCR

Viable *Alternaria* spp.

Commercial foodstuffs

## ABSTRACT

A real-time reverse-transcriptase PCR (RT-PCR) technique was developed for the rapid and specific detection and enumeration of viable *Alternaria* spp. in foodstuffs. The method uses *Alternaria*-specific primers and probe targeting the internal transcribed spacer regions ITS1 and ITS2 of the rRNA gene. The detection limit of the real-time RT-PCR assay to detect viable *Alternaria* spp. in food samples was 1 CFU/g. The estimated *Alternaria* counts obtained by real-time RT-PCR showed a good correlation ( $R^2 = 0.9881$ ,  $P < 0.01$ ) in the range of  $1-10^5$  CFU/mL with the *Alternaria* counts obtained by culture methods. The applicability of the real-time RT-PCR protocol was assessed through analysis of 110 commercial food samples, including 60 fresh fruit and vegetable samples and 50 processed foodstuffs. The assay developed provides a useful tool for early detection of low concentrations of viable *Alternaria* spp. in naturally contaminated food samples, and could be applied as a quality and biosecurity marker of raw materials and final products in the fruits and vegetables processing industries.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Alternaria* is a fungal genus that is often associated with the spoilage and biodeterioration of a large variety of foods and feedstuffs. There are about 300 accepted *Alternaria* species, many of which are also capable of producing mycotoxins, and they can contaminate raw or manufactured plant products like juices, sauces and preserves, constituting a potential health hazard for humans (Logrieco, Moretti, & Solfrizzo, 2009; Simmons, 2007). Exposure to *Alternaria* toxins has been related to a range of pathologies, from haematological disorders to esophageal cancer (Liu et al., 1992; Ostry, 2008).

Because of the importance of the genus *Alternaria* in food quality and safety, fast, sensitive, and reliable methods for the detection and enumeration of *Alternaria* spp. in foods are needed to identify possible routes of contamination and to design adequate strategies to prevent spoilage and reduce economical losses. Conventional methods for detecting food-borne fungi involve culturing the organisms in selective media, followed by the isolation of pure cultures, and finally the identification according to their morphological and biochemical characteristics (Andersen, Kroger, & Roberts, 2001; Andersen, Sorensen, Nielsen, van den Ende, & de Hoog, 2009; Bleve, Rizzoti, Dellagio, & Torriani, 2003). These methods are generally laborious and time-consuming, and they are

not suitable for routine analyses in quality control systems because the decisions on food processing are also delayed. Alternatives to direct colony counting, including molecular methods based on immunological and genotypic techniques have been developed for revealing the presence of undesirable microorganisms, including fungi, in different food matrices (Bleve et al., 2003; Kappe, Okeke, Fauser, Mainwald, & Sonntag, 1998; Li, Marquardt, & Abramanson, 2000).

Various methods involving DNA, mainly based on polymerase chain reaction (PCR) amplification, have been developed for the detection and identification of *Alternaria* spp. in foods. They include conventional or real-time PCR using specific primers (Andersen, Smedsgaard, Jorring, Skouboe, & Pedersen, 2006; Guillemette, Iacomini, & Simoneau, 2004; Konstantinova, Bonants, van Gent-Pelzer, van der Zouwen, & van den Bulk, 2002; Pavón, González, Pegels, Martín, & García, 2010; Pavón et al., 2011; Zur, Shimoni, Hallerman, & Kashi, 2002), and also PCR amplification followed by complementary techniques such as sequencing, PCR-RFLP, PCR-RAPD or PCR-AFLP (Bensassi, Zid, Rhouma, Bacha, & Hajlaoui, 2009; Diguta, Vincent, Guilloux-Benatier, Alexandre, & Rousseaux, 2011; Pryor & Michailides, 2002; Somma et al., 2011). Because DNA is a stable molecule, DNA-based methods cannot distinguish between living and dead cells. In contrast, RNA-based detection methods, like real-time RT-PCR, could be useful for detection of viable *Alternaria* spp. in raw vegetables. Early detection of low levels of viable *Alternaria* spp. in each lot of raw materials would help industry to

\* Corresponding author. Tel.: +34 913943747; fax: +34 913943743.  
E-mail address: [tgarcia@vet.ucm.es](mailto:tgarcia@vet.ucm.es) (T. García).



decide whether to use or refuse selected lots. This would ease the decision about the implementation of corrective actions during storage and processing to avoid mycotoxin production. However, RT-PCR would not be appropriate to detect *Alternaria* spp. in heat treated products where proliferation has occurred before processing. The detection of RNA by reverse transcriptase PCR (RT-PCR) has become a useful method for the detection of viable microorganisms, because certain types of RNA have a very short half-life (Hierro, Esteve-Zarzoso, González, Mas, & Guillamón, 2006; Sheridan, Masters, Shallcross, & Mackey, 1998). The suitability of rRNA and mRNA as cell viability indicators has been studied by various authors (Bleve et al., 2003; Mayoral, Martín, Hernández, González, & García, 2006; Sung, Hiett, & Stern, 2005; Vaitilingom, Gendre, & Brignon, 1998) in heat treated samples. These authors concluded that degradation of RNA molecules depends on the intensity of the treatment applied. However, because rRNA is a universal constituent of ribosomes and certain rRNA types can be present at thousands of copies per cell, targeting of this molecule can significantly improve detection limits.

The objective of this work was the development of a real-time RT-PCR technique based on the multicopy ITS genetic marker for the detection and quantification of viable *Alternaria* spp. cells in raw and processed fruits and vegetables.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Fungal strains and culture conditions

A total of 27 fungal strains were obtained from the CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands), the CECT (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain), the BCCM/MUCL (Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium) and our own collection (Table 1). They

were grown on Potato Dextrose Agar medium (PDA, Sigma, St.Louis, MO, USA), Malt Extract Agar (MEA, Pitt, 1980) and Potato Carrot Agar (PCA, Simmons, 1992). After inoculation, the PDA and MEA plates were incubated for 7 days at 25 °C (Pitt & Hocking, 1997). The PCA plates were incubated under alternating light/dark cycles consisting of 8 h of cool-white daylight fluorescent lamps followed by 16 h of darkness at 25° to induce the formation of the characteristic sporulation pattern. Identification of *Alternaria* cultures was confirmed according to Simmons (2007). To determine the detection limit of the assay, *Alternaria alternata* CBS 117143, *Alternaria porri* CBS 109.41, *Alternaria radicina* CBS 245.67 and *Alternaria infectoria* CBS 210.86 were grown in malt extract broth for 4 days at 25 °C. After homogenization in a pre-sterilized blender, serial dilutions were used for RNA extraction and plated on Sabouraud-CAF (Liofilchem s.r.l., Roseto degli Abruzzi, Italy).

### 2.2. RNA extraction

RNA extraction from the fungal cultures grown in MEA, PDA and malt extract broth was performed using the RiboPure™ – Yeast Kit (Ambion, Austin, TX, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE).

### 2.3. Mould viability assessment

To analyse the influence of thermal treatments on the stability of the total RNA extracted, 20 mL of the *Alternaria* malt extract broth cultures were heated at 90 °C for 5 min in a water bath. All the treated *Alternaria* cultures were incubated at room temperature (25 °C) for 0, 6, 24, and 48 h after heat treatment before RNA isolation. Cell viability of the heat treated cultures was analysed by plate count in Sabouraud-CAF.

The effect of heat treatment on the viability of an *A. alternata* culture was also analysed by flow cytometry after staining with propidium iodide (PI). A PI working solution of 100 µg mL<sup>-1</sup> was prepared in sterile phosphate-buffered saline (PBS; 136 mM NaCl, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.09 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, and 2.6 mM KCl, pH 7.2) and stored at 4 °C in the dark. One millilitre of a 10<sup>5</sup> CFU/mL *A. alternata* culture was analysed before and after heat treatment. One millilitre of a mixture of viable and heat treated cultures (1:1) was also analysed. The samples were centrifuged at 5500×g for 5 min, and each pellet was resuspended in 2 mL of sterile PBS. After a second centrifugation, the final pellet was resuspended in 1 mL of sterile PBS. Five microlitres of the PI working solution was added to the mould suspension to a final concentration of 0.5 µg mL<sup>-1</sup>. The mixture was incubated for 10 min on ice before flow cytometry analysis.

Following staining with PI, the samples were analysed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Sparks, Md.) with an argon laser operating at 488 nm. The filter configuration was standard for the FACScan: fluorescence detector one, 530/30 band pass; fluorescence detector two, 585/42 band pass; and fluorescence detector three, 650 long pass. The red fluorescence of PI signal was collected in the FL3 channel (650 long pass filter); 10,000 events were collected in list mode per sample. The analysis was performed using CELL Quest Software (Becton Dickinson).

Autofluorescence of unstained controls was measured through the same filter configuration as used for the stained samples with which they were matched.

### 2.4. Sample preparation for sensitivity assays

Five hundred grams of fresh tomatoes were scalded in boiling water, aseptically peeled off and the tomato pulp homogenized in

**Table 1**  
Mould strains used in this study.

Species	Strain	Source/origin
<i>Alternaria alternata</i>	CBS 154.31	<i>Staphylea trifolia</i>
	CBS 117130	Potted strawberry tree ( <i>Arbutus unedo</i> )
<i>A. arborescens</i>	CBS 117143	<i>Capsicum annuum</i> , fruits
	CBS 109730	Tomato
<i>A. citri</i>	MAP05 <sup>a</sup>	<i>Triticum</i> , grain
	CBS 192.81	<i>Citrus sinensis</i> , fruit
<i>A. dauci</i>	CBS 101592	Carrot seeds
<i>A. gaisen</i>	CBS 632.93	Leaf spot in <i>Pyrus pyrifolia</i>
<i>A. infectoria</i>	CBS 210.86	<i>Triticum</i>
	MAP03 <sup>b</sup>	<i>Triticum</i> , grain
	MAP04 <sup>b</sup>	<i>Triticum</i> , grain
	MAP08 <sup>b</sup>	<i>Triticum</i> , grain
<i>A. longipes</i>	CBS 917.96	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>A. porri</i>	CBS 109.41	–
<i>A. radicina</i> var. <i>radicina</i>	CBS 245.67	<i>Daucus carota</i>
<i>A. solani</i>	CBS 347.79	Fruit rot in <i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>A. tenuissima</i>	CBS 880.95	<i>Fragaria vesca</i>
	MAP01 <sup>c</sup>	<i>Triticum</i> , grain
	MAP02 <sup>c</sup>	<i>Triticum</i> , grain
	MAP06 <sup>c</sup>	<i>Triticum</i> , grain
	MAP07 <sup>c</sup>	<i>Triticum</i> , grain
	MAP09 <sup>c</sup>	<i>Triticum</i> , grain
	MAP10 <sup>c</sup>	<i>Triticum</i> , grain
<i>Aspergillus ochraceus</i>	MUCL 14207	Cotyledon, <i>Coffea robusta</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>	CECT 2866	Tomato
<i>Penicillium expansum</i>	CECT 2278	Mould-fermented sausage
<i>Rizopus stolonifer</i>	CECT 2344	–

<sup>a</sup> Member of the *A. arborescens* species-group based on morphology.

<sup>b</sup> Member of the *A. infectoria* species-group based on morphology.

<sup>c</sup> Member of the *A. tenuissima* species-group based on morphology.



a pre-sterilized blender. To assess the absence of fungal contamination, the tomato pulp samples were plated in Sabouraud-CAF, and incubated at 25 °C for 48 h. Moreover, 1 mL aliquots of tomato pulp were tested in triplicate by real-time RT-PCR using the *Alternaria* specific primers and amplification conditions described below. Samples that tested negative for *Alternaria* spp. by culture techniques and real-time RT-PCR were used for the inoculation experiment.

Samples of tomato pulp (0.9 mL) were inoculated with 0.1 mL of different *Alternaria* culture dilutions ( $10^5$ – $10^{-1}$  CFU/mL). One millilitre non-inoculated aliquot was included as negative control.

RNA extraction from 1 mL samples of tomato pulp inoculated with *Alternaria* culture dilutions was carried out as described for *Alternaria* cultures. Moreover, tomato pulp samples and the culture dilutions used for inoculation were serially diluted in sterile PBS and plated on Sabouraud-CAF. Moulds were enumerated after incubation at 25 °C for 48 h.

## 2.5. Primers and probe design

The oligonucleotides Dir1ITSalt and Inv1ITSalt used in the real-time RT-PCR assay were designed in a previous work for amplification of *Alternaria* spp. DNA (Pavón et al., 2011). These primers were designed on the basis of rDNA sequences from various fungal, animal and plant species available in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database. These primers hybridize on the internal transcribed spacer (ITS1 and ITS2) regions of *Alternaria* spp., and delimit a DNA fragment of approximately 370 bp in all the *Alternaria* spp. analysed.

Taqman probe, AltTM (5' 6FAM-AACACCAAGCAAAGCTT-GAGGGTACAAAT-TMR 3') was designed with the aid of the EMBOS software package, version 2.2.0, and Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) based on alignment and comparison of the fragment generated by amplification of the corresponding *Alternaria* target, and was labelled on the 5' end with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM), and on the 3' end with 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine (TAMRA). TaqMan probe was synthesized by TibMolBiol (Berlin, Germany).

## 2.6. Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR was performed in two steps. First, the reverse transcription (RT) was carried out using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) following the protocol recommended by the manufacturer. RT reactions were performed in a total volume of 20 µL. Each RT mixture contained 10 µL of RNA, 2 µL of 10X RT random primers, 2 µL of 10X RT buffer, 0.8 µL 25X dNTP Mix (100 mM), 1 U of RNase inhibitor, 50 U of MultiScribe™ Reverse Transcriptase, and nuclease-free water to a final volume of 20 µL. Negative controls without MultiScribe™ Reverse Transcriptase were always included to check for the presence of contaminant DNA. Reaction mixtures were incubated in a Progene thermal cycler (Techne, Cambridge, UK) at 25 °C for 10 min and then at 37 °C for 120 min, with a final incubation at 85 °C for 5 min to inactivate the reverse transcriptase.

As a second step, to quantify cDNA generated by reverse transcription from target RNA, real-time PCR with Taqman probe was run under generic cycling conditions. The PCR reactions were carried out using the LightCycler TaqMan Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 2 pmol of AltTM TaqMan probe (TibMolBiol), and 2.5 µL of the template (undiluted cDNA from the reverse transcription reaction product). Different concentrations of each primer (50, 300 and 900 nM) were tested to determine the optimum primer concentration. Amplification reactions were performed in a total reaction volume of 10 µL in a glass capillary tube and were run on the LightCycler 2.0 Instrument (Roche Applied

Science, Pörsching, Germany) with the following program: 10 min at 95 °C (denaturation and Taq polymerase activation), an amplification program of 45 cycles at 95 °C for 10 s, 60 °C for 60 s, and 72 °C for 1 s. Samples were then cooled to 40 °C for 30 s. Real-time PCR reactions were carried out in triplicate for each RNA extract. The crossing point value ( $C_p$ ), which refers to the cycle number where the sample's fluorescence significantly increases above the background level, was calculated automatically by the LightCycler software as the first maximum of the second derivative of the curve.

## 2.7. Specificity and sensitivity of the real-time RT-PCR

The specificity of the primers and probe was tested by real-time RT-PCR analysis of RNA obtained from 11 *Alternaria* species and also from several mould (Table 1), bacterial, yeast, animal and plant species.

Sensitivity assays were carried out using 10-fold dilutions of *Alternaria* cultures in PBS (either viable or heat treated as described above), and also using experimentally inoculated tomato pulp. Nine hundred microlitres of tomato pulp samples were inoculated with 0.1 mL of *Alternaria* cultures with approximately  $10^5$  to  $10^{-1}$  CFU/mL (determined by plate count in CAF-Sabouraud). Following RNA isolation from the *Alternaria* culture dilutions and inoculated tomato samples, the real-time RT-PCR reactions were carried out in triplicate in three independent experiments. Standard curves were plotted with the  $C_p$  values against the logarithm of *Alternaria* counts in CAF-Sabouraud. The amplification efficiency,  $E$ , was calculated from the slope of the standard curve using the following formula (Bustin et al., 2009):

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

$$\% \text{ Efficiency} = (E - 1) \times 100$$

Additionally, precision of the assay was evaluated by comparing the coefficient of variation (CV) values obtained in three different days versus those obtained in the same day, to assess the influence of the day of analysis in the data obtained.

## 2.8. Analysis of commercial samples

Twenty samples of raw tomato fruit, 30 samples of tomato products (20 of sun-dried tomato, 3 of canned tomato products, 3 samples of ketchup and 4 of tomato sauces), 20 samples of dried pepper, 15 of carrots, 15 of strawberry fruits, and 10 samples of apple fruit were obtained from several local supermarkets and retail shops. Samples were homogenized in a stomacher (IUL Instruments, Barcelona, Spain) and stored at –20 °C in airtight containers until used.

Total RNA extraction from raw and processed fruits and vegetables was performed using the RiboPure™ – Yeast Kit. RNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. *Alternaria* counts were determined as follows: sample dilutions were plated in Sabouraud-CAF, and fungal colonies grown after incubation at 25 °C for 48 h, were transferred onto a PCA plate and incubated under alternating light/dark cycles. *Alternaria* colonies were identified according to Simmons (2007) with the aid of a stereomicroscope Olympus SZX10 (Olympus, Hamburg, Germany) and a microscope Olympus BX40 (400× magnification) (Olympus).

## 2.9. Statistical analysis of data

All statistical analyses were performed using Statgraphics Centurion 15.2.14 (XV) (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia, USA). Linear correlation was applied to model the relationship between  $C_p$  values obtained from *Alternaria* cultures or



inoculated tomato pulp and the logarithm of *Alternaria* counts. Pearson correlation analysis was used to evaluate the relationships between the estimated *Alternaria* counts and the plate counts obtained as described above.

### 3. Results and discussion

Fungal diseases and postharvest decay of fruits and vegetables produce considerable economical losses to growers and the food processing industry, and *Alternaria* spp. are frequently involved in these processes (Logrieco et al., 2009). In this work, *A. alternata*, *A. infectoria*, *A. porri* and *A. radicina* were used as reference species of the four main species-groups of the genus (Hong, Cramer, Lawrence, & Pryor, 2005; Pryor & Gilbertson, 2000). They have been used for the development of a real-time RT-PCR assay based on amplification of a *Alternaria*-specific fragment of ITS region in raw and processed vegetables.

The real-time RT-PCR assay developed in this work is based on a genus-specific primer pair and a TaqMan probe designed on the internal transcribed spacer regions ITS1 and ITS2. The optimum primers concentrations yielding the highest endpoint fluorescence and the lowest *C<sub>p</sub>* were experimentally determined as 300 nM for forward primer and 900 nM for reverse primer. This real-time RT-PCR system amplified the *Alternaria*-specific fragment in all the *Alternaria* isolates analysed, with *C<sub>p</sub>* values between 11.26 and 12.76, but did not amplify RNA from several fungal, bacterial, yeast, animal or plant species tested (Table 2).

#### 3.1. Real-time RT-PCR analysis of viable and heat inactivated *Alternaria* cultures

The sensitivity and detection limits of the real-time RT-PCR assay were tested on total RNA from viable or heat inactivated *Alternaria* culture dilutions ranging from  $10^5$  to  $10^1$  CFU/mL. Good linear correlations were obtained between the log of *A. alternata* (Fig. 1A), *A. infectoria* (Fig. 1B), *A. radicina* (Fig. 1C) and *A. porri* (Fig. 1D) counts and the crossing point values obtained for each viable culture, with  $R^2$  values higher than 0.99, indicating that the real-time RT-PCR system was highly linear. The sensitivity of the method (lowest *Alternaria* spp. counts producing rRNA amplification) was 1 CFU/mL regardless the *Alternaria* spp. tested. Compared to previous DNA-based results using primers targeting the *Alt* 1 gene (Pavón et al., 2010) or the same ITS-based primers in a PCR method (Pavón et al., 2011), the real-time RT-PCR assay described herein improved 100-fold the sensitivity. Such improvement can be explained because of the presence of a higher number of RNA copies and the use of a real-time format.

The amplification efficiency was determined by the slope of the standard curve. Fig. 1 shows that the slopes of the linear equations obtained from viable culture were  $-3.51$  for *A. alternata* (Fig. 1A),  $-3.5$  for *A. infectoria* (Fig. 1B),  $-3.58$  for *A. radicina* (Fig. 1C), and  $-3.53$  for *A. porri* (Fig. 1D), which corresponded to amplification efficiencies of 92.7%, 93.03%, 90.4%, and 92.04%, respectively. Efficiencies for an optimal Q-PCR should be between 90% and 105%. Lower reaction efficiencies may be caused by poor primer design or suboptimal conditions. Reaction efficiencies  $>100\%$  may indicate pipetting error or contaminations (Dorak, 2006; González-Salgado, Patiño, Gil-Serna, Vázquez, & González-Jaén, 2009). The coefficients of variation (CV) of the crossing point (*C<sub>p</sub>*) values obtained in triplicate assays from 3 independent real-time RT-PCR experiments were lower than 1%, for all *Alternaria* culture dilutions.

The suitability of ITS rRNA as an indicator of *Alternaria* spp. viability was evaluated on the basis of the ability of the real-time RT-PCR assay to amplify RNA samples extracted from *Alternaria* cultures ( $10^5$  to  $10^1$  CFU/mL) heated at 90 °C for 5 min. These

**Table 2**

Specificity of the *Alternaria*-specific real-time RT-PCR system. *C<sub>p</sub>* values (mean and standard deviation) obtained in triplicate assays.

Species	<i>Alternaria</i> spp. RT-PCR system
<i>Alternaria alternata</i> CBS 154.31	12.08 ± 0.12
<i>A. alternata</i> CBS 117130	11.45 ± 0.04
<i>A. alternata</i> CBS 117143	12.03 ± 0.13
<i>A. arborescens</i> CBS 109730	12.32 ± 0.07
<i>A. arborescens</i> MAP05	11.65 ± 0.09
<i>A. citri</i> CBS 192.81	12.03 ± 0.06
<i>A. dauci</i> CBS 101592	12.76 ± 0.11
<i>A. gaisen</i> CBS 632.93	12.01 ± 0.11
<i>A. infectoria</i> CBS 210.86	12.34 ± 0.18
<i>A. infectoria</i> MAP03	12.09 ± 0.02
<i>A. infectoria</i> MAP04	11.79 ± 0.09
<i>A. infectoria</i> MAP08	11.26 ± 0.06
<i>A. longipes</i> CBS 917.96	11.34 ± 0.10
<i>A. porri</i> CBS 109.41	11.76 ± 0.12
<i>A. radicina</i> var. <i>radicina</i> CBS 245.67	12.24 ± 0.06
<i>A. solani</i> CBS 347.79	12.37 ± 0.07
<i>A. tenuissima</i> CBS 880.95	11.89 ± 0.04
<i>A. tenuissima</i> MAP01	11.71 ± 0.03
<i>A. tenuissima</i> MAP02	12.33 ± 0.16
<i>A. tenuissima</i> MAP06	12.56 ± 0.13
<i>A. tenuissima</i> MAP07	11.34 ± 0.10
<i>A. tenuissima</i> MAP09	11.54 ± 0.17
<i>A. tenuissima</i> MAP10	12.02 ± 0.07
<i>Aspergillus ochraceus</i> MUCL 14207	— <sup>a</sup>
<i>Fusarium oxysporum</i> CECT 2866	—
<i>Penicillium expansum</i> CECT 2278	—
<i>Rhizopus stolonifer</i> CECT 2344	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CECT 1347	—
<i>Escherichia coli</i>	—
Oats	—
Soya	—
Tomato	—
Barley	—
Almond	—
Pistachio	—
Carrot	—
Apple	—
Strawberry	—
Pepper	—
Hazelnut	—
Goat	—
Hake	—
Chicken	—

<sup>a</sup> Indicates no positive signal after 45 PCR cycles.

treatments were chosen because they are similar to those usually applied in the tomato processing industry (Iniesta, Pérez-Conesa, García-Alonso, Ros, & Periago, 2009). The specific rRNA fragment was detected by real-time RT-PCR from samples containing the highest concentrations of inactivated *Alternaria* cultures ( $10^5$  to  $10^3$  CFU/mL) immediately after the heat treatment. However, during subsequent incubation of heat treated samples at room temperature, a progressive reduction of amplifiable rRNA was obtained with detection limits of  $10^4$  and  $10^5$  CFU/mL when RNA was isolated 6 and 24 h after the heat treatment, respectively. Amplification of the target was not achieved from RNA extracted 48 h after the heat treatment. It should be noted that, when cell viability was evaluated by plate count on Sabouraud-CAF, no colonies were detected after heat treatment even at the highest *Alternaria* spp. concentration. This analysis revealed that some *Alternaria* spp. cells could be injured, but maintained their metabolic activity up to 24 h after the heat treatment.

#### 3.2. Real-time RT-PCR analysis of experimentally contaminated tomato pulp samples

The effect of the food matrix on the detection of *Alternaria* spp. was studied by analysis of tomato pulp samples artificially

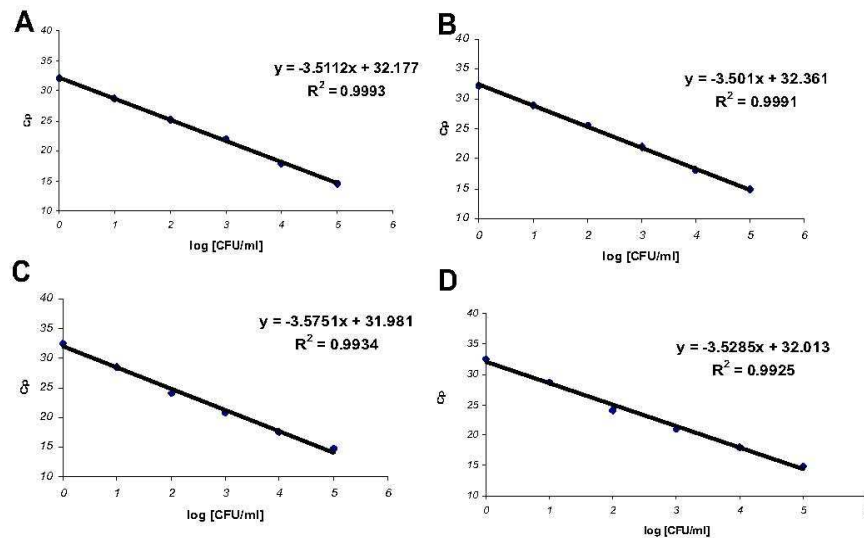


Fig. 1. Standard curves obtained with *A. alternata* (1A), *A. infectoria* (1B), *A. radicina* (1C), and *A. porri* (1D) viable cultures, showing the correlation between the  $C_p$  values and the logarithm of *Alternaria* counts.

contaminated with either viable or heat inactivated *Alternaria* cultures. When total RNA was extracted from samples inoculated with viable *Alternaria* cultures at concentrations of  $10^5$  to  $10^1$  CFU/mL, the rRNA was successfully amplified, with a detection limit of 1 CFU/mL. Using tomato pulp samples inoculated with viable *A. alternata* culture as template, a good linear relationship was observed between the  $\log$  of *A. alternata* counts and the crossing point values; the slope of the curve was  $-3.51$ , and the square regression coefficient was  $0.997$  (Fig. 2). CVs of  $C_p$  values for tomato pulp inoculated with viable culture were in the range of  $0.03$ – $0.34\%$ . Similar results were obtained for amplification of rRNA from tomato pulp inoculated with *A. infectoria*, *A. porri*, and *A. radicina* viable cultures (results not shown). The low CV values obtained revealed high reproducibility of the real-time RT-PCR assay to quantify *Alternaria* spp. in contaminated tomato pulp. ITS rRNA was not amplified from uninoculated samples, and no residual DNA was found in the samples analysed. In addition, one-way analysis of variance (ANOVA) was used to look for significant differences between the  $C_p$  values from *Alternaria* spp. viable cultures and inoculated tomato pulp standard curves. There were no significant differences ( $P < 0.0001$ ) between the  $C_p$  values

obtained for each *Alternaria* concentration regardless the *Alternaria* species and the presence of tomato DNA. Thus, a new standard curve was generated ( $R^2 = 0.992$ ) pooling together the data from *Alternaria* spp. viable cultures and tomato pulp inoculated with these cultures (Fig. 3).

When tomato pulp samples were inoculated with heat inactivated *Alternaria* cultures ( $90^\circ\text{C}$  for 5 min), the reduction of the RNA stability resembled the results obtained for heat inactivated culture samples, and no growth was observed on Sabouraud-CAF after heat treatment. According to the results obtained, the tomato matrix does not negatively interfere with total *Alternaria* RNA extraction and amplification.

### 3.3. Assessment of *Alternaria alternata* viability by flow cytometry

Flow cytometry provides a powerful and versatile approach to quantification of dead cells. A wide variety of fluorescent probes can enter into damaged cells, which are unable to exclude these dyes because of disruption of the cell membrane (Bleve et al., 2003; Mayoral et al., 2006). Propidium iodide (PI) is the most widely used dye to detect dead cells, because PI carries two positive charges that

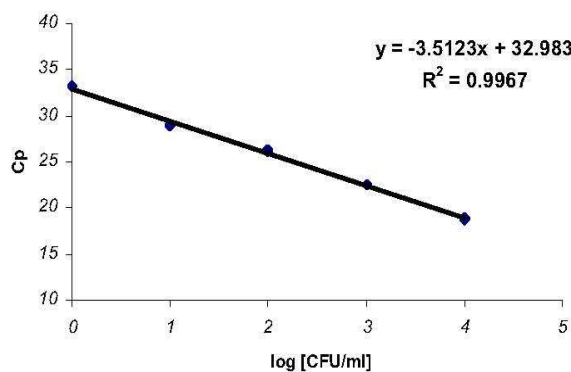


Fig. 2. Standard curve obtained with tomato pulp inoculated with *A. alternata* viable culture, showing the correlation between the  $C_p$  values and the logarithm of *Alternaria* counts.

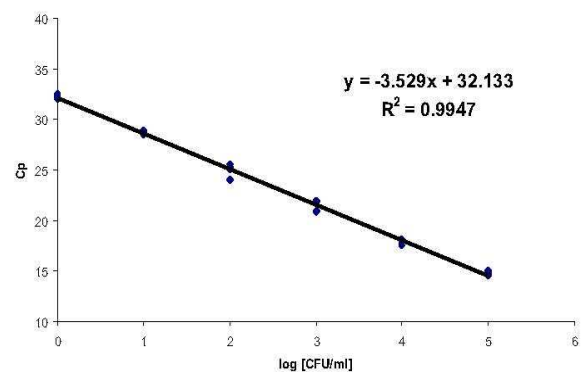


Fig. 3. Representative standard curve generated using the data from *Alternaria* spp. cultures and tomato pulp inoculated with these cultures, showing the correlation between the  $C_p$  values and the logarithm of *Alternaria* counts.



prevent it from entering intact cells. This property makes PI appropriate for the confirmation of heat inactivation efficiency. The use of flow cytometry in combination with fluorescent dyes as a technique to rapidly differentiate and enumerate bacterial and yeast cells is well established (Bell et al., 1998; Bleve et al., 2003; Mayoral et al., 2006; Melacrino, Zapparoli, Torriani, & Dellaglio, 2001). Moreover, previous methods used to measure dead cells in filamentous fungi include quantification of conidial death by flow cytometric analysis of PI uptake (Jahn et al., 1998; Michaliszyn, Senechal, Martel, & de Repentigny, 1995).

To assess the percentage of dead cells resulting from heat treatment and to explain the persistence of rRNA in samples with initial counts of  $10^5$  CFU/mL, a pre-homogenized *A. alternata* viable culture of  $10^5$  CFU/mL was heated at 90 °C for 5 min. Then viable and heat inactivated *A. alternata* cultures, as well as a mixture of viable and heated cultures (1:1), were stained with PI before analysis by flow cytometry. When cells of viable culture were stained with PI at  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , only 1.27% was dead (Fig. 4A). However, when samples of heat inactivated culture were stained just after the heat treatment, the percentage of dead cells was 98.05%. Thus, 1.95% of the initial *A. alternata* population maintained some metabolic activity just after the heat treatment and contained ITS rRNA target fragments that could be detected by real-time RT-PCR (Fig. 4B). Moreover, when the mixture of both cultures was stained, the percentage of dead cells was 49.54 (Fig. 4C). Thus, in

a culture sample with initial counts of  $10^5$  CFU/mL, there would be at least  $10^3$  *Alternaria* cells from which RNA could be amplified after heat treatment, despite the fact that these cells could not multiply on Sabouraud-CAF.

### 3.4. Analysis of commercial samples

The reliability of the real-time RT-PCR procedure to detect viable *Alternaria* cells in 110 commercial samples was tested in raw and processed fruits and vegetables (Table 3). These products were collected from retail markets, and 30 samples (10 tomatoes, 10 strawberries, 5 carrots, and 5 apples) showed some evidence of spoilage, probably associated with mould activity. The real-time RT-PCR analysis demonstrated the presence of *Alternaria* spp. rRNA in 53 out of the 110 samples analysed (48.2%). *Alternaria* counts were determined by plating on Sabouraud-CAF followed by identification in PCA, because *Alternaria* sporulates well on this media and the genus identification can be carried out more easily (Andersen et al., 2001).

At the genus level, the most dominant fungal genera isolated together with *Alternaria* were *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Cladosporium*, usually detected in apples, carrots, strawberries and tomatoes (Andersen & Frisvad, 2004; Ellis & Ellis, 1997). *Rhizopus* and *Penicillium* occurred with higher frequencies in sun-dried tomatoes, and dried peppers than in carrots, tomatoes or

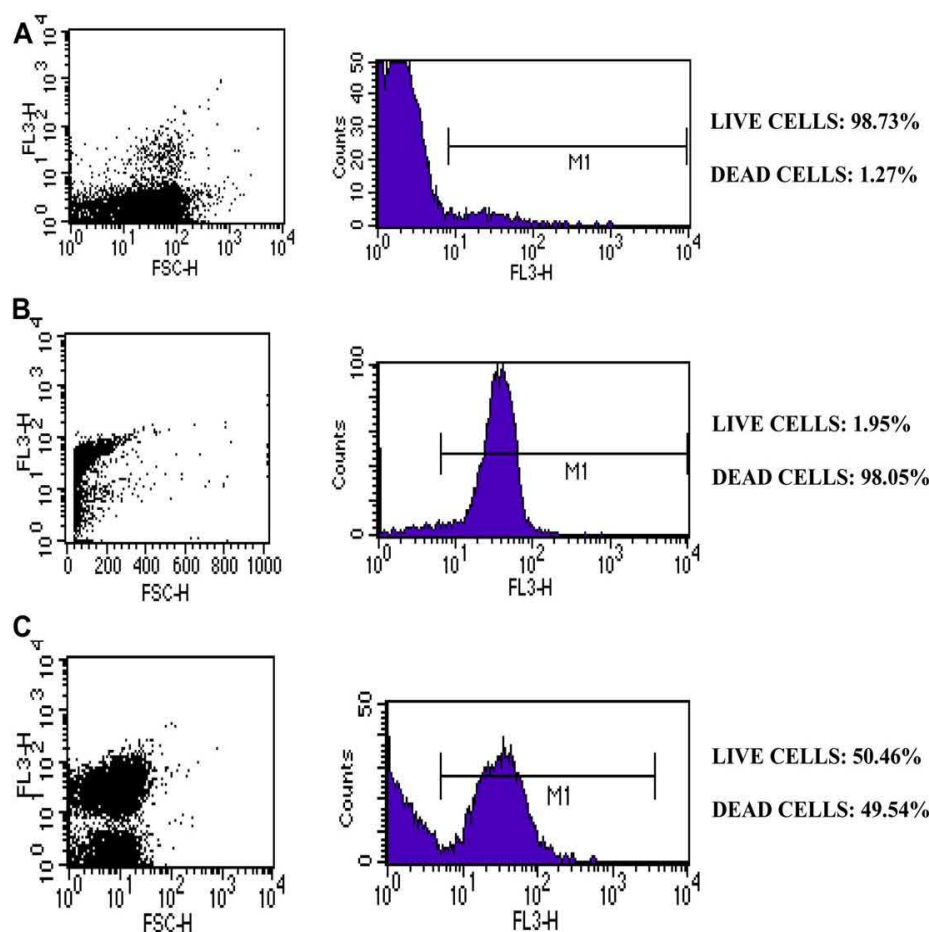


Fig. 4. Flow cytometry analysis of an *A. alternata* culture before (A) and after (B) heat treatment at 90 °C for 5 min, and a mixture of viable and heated cultures (1:1) (C) stained with  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  PI. M1 delimits the death cells.

Table 3

$C_p$  values (mean and standard deviation) and estimated *Alternaria* concentration obtained from raw and processed vegetables and fruit samples in the real-time RT-PCR *Alternaria*-specific system. Results are compared to *Alternaria* spp. counts determined by culture methods.

Type of product (No. samples)	<i>Alternaria</i> spp. RT-PCR system	<i>Alternaria</i> counts estimated (CFU/g)	<i>Alternaria</i> counts (CFU/g)
Unspoiled tomatoes (10) <sup>b</sup>	— <sup>a</sup>	—	—
Mouldy tomato TA135	17.88 ± 0.05	1.2 × 10 <sup>4</sup>	2 × 10 <sup>4</sup>
Mouldy tomato TA136	18.09 ± 0.02	1.0 × 10 <sup>4</sup>	2 × 10 <sup>4</sup>
Mouldy tomato TA137	21.22 ± 0.03	1.4 × 10 <sup>3</sup>	2 × 10 <sup>3</sup>
Mouldy tomato TA138	21.56 ± 0.11	1.1 × 10 <sup>3</sup>	2 × 10 <sup>3</sup>
Mouldy tomato TA139	23.35 ± 0.05	3.5 × 10 <sup>2</sup>	6 × 10 <sup>2</sup>
Mouldy tomato TA140	23.14 ± 0.08	3.9 × 10 <sup>2</sup>	6 × 10 <sup>2</sup>
Mouldy tomato TA141	20.39 ± 0.02	2.3 × 10 <sup>3</sup>	9 × 10 <sup>3</sup>
Mouldy tomato TA142	19.64 ± 0.17	3.8 × 10 <sup>3</sup>	5 × 10 <sup>3</sup>
Mouldy tomato TA143	24.62 ± 0.19	1.5 × 10 <sup>2</sup>	3 × 10 <sup>2</sup>
Mouldy tomato TA144	19.17 ± 0.11	5.1 × 10 <sup>3</sup>	6 × 10 <sup>3</sup>
Canned tomatoes (3) <sup>c</sup>	—	—	—
Ketchup (3) <sup>d</sup>	—	—	—
Tomato sauces (4) <sup>e</sup>	—	—	—
Sun-dried tomatoes (11) <sup>f</sup>	—	—	—
Sun-dried tomato TA123	20.05 ± 0.04	2.9 × 10 <sup>3</sup>	4 × 10 <sup>3</sup>
Sun-dried tomato TA124	20.38 ± 0.14	2.3 × 10 <sup>3</sup>	4 × 10 <sup>3</sup>
Sun-dried tomato TA125	21.65 ± 0.03	1.0 × 10 <sup>3</sup>	2 × 10 <sup>3</sup>
Sun-dried tomato TA126	21.59 ± 0.11	1.1 × 10 <sup>3</sup>	2 × 10 <sup>3</sup>
Sun-dried tomato TA127	20.95 ± 0.15	1.6 × 10 <sup>3</sup>	4 × 10 <sup>3</sup>
Sun-dried tomato TA128	20.16 ± 0.08	2.7 × 10 <sup>3</sup>	6 × 10 <sup>3</sup>
Sun-dried tomato TA145	26.66 ± 0.07	40	1 × 10 <sup>2</sup>
Sun-dried tomato TA147	31.01 ± 0.14	2	10
Sun-dried tomato TA149	31.12 ± 0.18	2	10
Dried peppers (2) <sup>g</sup>	—	—	—
Dried pepper TA153	30.2 ± 0.19	4	10
Dried pepper TA154	30.04 ± 0.02	4	10
Dried pepper TA156	27.3 ± 0.21	26	50
Dried pepper TA157	25.34 ± 0.19	93	1 × 10 <sup>3</sup>
Dried pepper TA158	26.28 ± 0.12	51	100
Dried pepper TA159	26.12 ± 0.12	56	100
Dried pepper TA160	22.09 ± 0.08	7.7 × 10 <sup>2</sup>	1 × 10 <sup>3</sup>
Dried pepper TA161	25.99 ± 0.11	61	100
Dried pepper TA163	16.66 ± 0.12	2.6 × 10 <sup>4</sup>	5 × 10 <sup>4</sup>
Dried pepper TA164	20.55 ± 0.17	2.1 × 10 <sup>3</sup>	3 × 10 <sup>3</sup>
Dried pepper TA165	25.22 ± 0.04	1.0 × 10 <sup>2</sup>	1 × 10 <sup>2</sup>
Dried pepper TA166	16.25 ± 0.03	3.4 × 10 <sup>4</sup>	6 × 10 <sup>4</sup>
Dried pepper TA167	17.63 ± 0.17	1.4 × 10 <sup>4</sup>	2 × 10 <sup>4</sup>
Dried pepper TA168	17.01 ± 0.20	2.1 × 10 <sup>4</sup>	4 × 10 <sup>4</sup>
Dried pepper TA169	18.81 ± 0.08	6.5 × 10 <sup>3</sup>	1 × 10 <sup>4</sup>
Dried pepper TA170	17.24 ± 0.11	1.8 × 10 <sup>4</sup>	3 × 10 <sup>4</sup>
Dried pepper TA171	22.87 ± 0.23	4.6 × 10 <sup>2</sup>	3 × 10 <sup>3</sup>
Dried pepper TA172	18.01 ± 0.19	1.1 × 10 <sup>4</sup>	2 × 10 <sup>4</sup>
Unspoiled carrots (10) <sup>h</sup>	—	—	—
Mouldy carrot (3) <sup>i</sup>	—	—	—
Mouldy carrot TA219	30.64 ± 0.02	3	10
Mouldy carrot TA221	25.69 ± 0.13	74	2 × 10 <sup>2</sup>
Unspoiled strawberries (4) <sup>j</sup>	—	—	—
Unspoiled strawberry TA195	30.18 ± 0.12	4	10
Mouldy strawberry TA203	31.1 ± 0.11	2	10
Mouldy strawberry TA204	24.61 ± 0.03	1.5 × 10 <sup>2</sup>	3 × 10 <sup>2</sup>
Mouldy strawberry TA205	26.19 ± 0.18	54	2 × 10 <sup>2</sup>
Mouldy strawberry TA206	25.17 ± 0.13	1.0 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>2</sup>
Mouldy strawberry TA207	24.57 ± 0.02	1.5 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>2</sup>
Mouldy strawberry TA208	24.84 ± 0.13	1.3 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>2</sup>
Mouldy strawberry TA209	25.03 ± 0.17	1.1 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>2</sup>
Mouldy strawberry TA210	25.26 ± 0.19	98	2 × 10 <sup>2</sup>
Mouldy strawberry TA211	24.03 ± 0.04	2.2 × 10 <sup>2</sup>	3 × 10 <sup>2</sup>
Mouldy strawberry TA212	—	—	—
Unspoiled apples (5) <sup>k</sup>	—	—	—
Mouldy apple TA213	24.59 ± 0.16	1.5 × 10 <sup>2</sup>	3 × 10 <sup>2</sup>
Mouldy apple TA214	25.64 ± 0.07	77	2 × 10 <sup>2</sup>
Mouldy apple TA215	—	—	—
Mouldy apple TA216	26.04 ± 0.09	59	1 × 10 <sup>2</sup>
Mouldy apple TA217	25.93 ± 0.11	64	1 × 10 <sup>2</sup>

<sup>a</sup> Indicates no positive signal after 45 PCR cycles.

<sup>b</sup> Unspoiled tomatoes: TA172, TA173, TA174, TA175, TA176, TA177, TA178, TA179, TA180 and TA181.

<sup>c</sup> Canned tomatoes: TA032, TA035 and TA052.

<sup>d</sup> Ketchup: TA036, TA074 and TA078.

<sup>e</sup> Tomato sauce: TA043, TA047, TA081 and TA109.

<sup>f</sup> Sun-dried tomatoes: TA129, TA130, TA131, TA132, TA133, TA134, TA146, TA148, TA150, TA151 and TA152.

<sup>g</sup> Dried peppers: TA155 and TA162.

<sup>h</sup> Unspoiled carrots: TA183, TA184, TA185, TA186, TA187, TA188, TA189, TA190, TA191 and TA192.

<sup>i</sup> Mouldy carrots: TA218, TA220 and TA222.

<sup>j</sup> Unspoiled strawberries: TA193, TA194, TA196 and TA197.

<sup>k</sup> Unspoiled apples: TA198, TA199, TA200, TA201 and TA202.



strawberries, and they were absent in apple samples. *Fusarium* contamination was detected only from apple and tomato samples. Finally, *Cladosporium* was isolated from strawberry samples but also occurred in apples and tomatoes. Regarding *Alternaria* contamination, the results obtained by culture methods in naturally contaminated samples were compared to estimated counts obtained by real-time RT-PCR, by substitution of the  $C_p$  values in the standard curve equation. *Alternaria* growth was not detected in any of the unspoiled samples analysed, with the exception of unspoiled strawberry TA195, where *Alternaria* counts were 10 CFU/g. Moreover, TA195 was the only unspoiled sample where *Alternaria* rRNA was detected, with  $C_p$  value of 30.18, corresponding to 6 CFU/g. On the contrary, *Alternaria* spp. rRNA was frequently isolated from the spoiled samples analysed: 4 out of 5 apple samples (80%), 2 out of 5 spoiled carrot samples (40%), 9 out of 10 spoiled strawberry samples (90%), and all the spoiled tomato samples tested positive by real-time RT-PCR, with  $C_p$  values between 17.88 and 30.64. *Alternaria* counts in PCA of spoiled raw fruit and vegetables samples that tested positive by real-time RT-PCR were between 10 and  $2 \times 10^4$  CFU/g. Finally, no amplification was obtained by real-time RT-PCR in the samples where *Alternaria* counts in PCA were negative.

In the processed foodstuffs analysed, amplification of *Alternaria* rRNA by real-time RT-PCR was obtained in 9 out of 20 sun-dried tomato samples (45%) and 18 out of 20 dried pepper samples (90%) (Table 3). These samples had been elaborated with traditional drying methods, which may offer optimal environmental conditions for mould growth and mycotoxin production, and could explain the high *Alternaria* counts in many sun-dried tomato and dried pepper samples. The absence of viable *Alternaria* cells, and hence the negative real-time RT-PCR result in the ketchup, canned tomato and tomato sauce samples analysed was expected, due to the heat treatments used in the tomato processing industry to obtain these long shelf-life products (Iniesta et al., 2009).

The estimated *Alternaria* counts obtained by real-time RT-PCR were plotted against the *Alternaria* counts obtained by plating on PCA (Fig. 5), showing a significant correlation ( $R^2 = 0.9881$ ,  $P < 0.01$ ) between both methods to detect and quantify viable *Alternaria* spp. in naturally contaminated samples.

The results obtained in this work are in agreement with previous studies reporting frequent isolation of toxigenic *Alternaria* strains in tomato fruits affected by black mould, that leads to substantial economical losses, especially in tomatoes for canning (Logrieco et al., 2009; Ostry, 2008; Pavón et al., 2010, 2011; Pose,

Patriarca, Kyanko, Pardo, & Fernández, 2010; Terminiello, Patriarca, Pose, & Fernández, 2006). Jackson and Al-Taher (2008) reported the occurrence of *Alternaria* mycotoxins in spoiled apples containing mouldy core-rot. Other studies, found that *A. radicina* and *A. dauci* are the most important seed-borne pathogens on carrots, causing black rot of roots and leaf blight, respectively (Konstantinova et al., 2002; Solfrizzo, de Girolamo, Vitti, Visconti, & van den Bulk, 2004; Tytkowska, 1992). Moreover, black rot infection of *A. alternata* occurs on pepper fruits when they are over-ripened or injured by sunlight, and the presence of *Alternaria* mycotoxins was reported by Bottalico and Logrieco (1998) in samples of peppers with black spot. Finally, Gryn and Szeke (1995) reported the presence of AOH in strawberry samples. Most of the samples analysed in the above-mentioned studies were spoiled fruits with mouldy diseases, and their direct consumption is not probable. However, the use of mouldy-core rot fruits in the production of manufactured products like juices, sauces or preserves constitutes a health risk for consumers, because high levels of *Alternaria* mycotoxins could be present in the commercial processed products (Barkai-Golan & Paster, 2008; Pavón et al., 2012). Moreover, it should be noted that the mycotoxins produced in raw materials are not destroyed during most food processing operations, resulting in contamination of finished products (Andersen & Frisvad, 2004; Siegel, Feist, Proske, Koch, & Nehls, 2010). Chemical analysis to detect *Alternaria* mycotoxins in foodstuffs is cumbersome and expensive, however, a rapid detection of viable *Alternaria* spp. in raw materials would allow food industry to develop preventive and control strategies in order to avoid the presence of *Alternaria* mycotoxins in processed foodstuffs. Thus, this real-time RT-PCR method could be used as a quality and biosecurity marker of raw materials where *Alternaria* spp. and their toxins can be present.

In conclusion, we have developed a rapid, sensitive, and reliable real-time RT-PCR assay based on the amplification of ITS rRNA for the detection and quantification of viable *Alternaria* spp. in a variety of fruits and vegetables, that could help industry on the refusal or acceptance of raw materials for processing. However, because this technique does not detect the presence of dead cells, it would not be appropriate for analysis of heat treated products where *Alternaria* proliferation has occurred before processing. A positive RT-PCR result implies active metabolism of *Alternaria* spp., and the potential production of mycotoxins that should be avoided with the implementation of preventive and corrective actions during storage and processing. Early detection of viable *Alternaria* spp. contamination in raw vegetables by this method will not only assist with controlling dissemination of contaminated product but also could assist in development of control strategies and as a validation tool for effective HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) plans.

### Acknowledgements

This study was supported by Grant No. AGL 2006-07659 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the Programa de Vigilancia Sanitaria 2009/AGR-1489 from the Comunidad de Madrid (Spain). Miguel Ángel Pavón is recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

Authors thank Amalia Vázquez (CAI Microscopía y Citometría, UCM) for her assistance with the flow cytometry analysis.

### References

- Andersen, B., & Frisvad, J. (2004). Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7507–7513.
- Andersen, B., Kroger, E., & Roberts, R. G. (2001). Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research*, 105, 291–299.

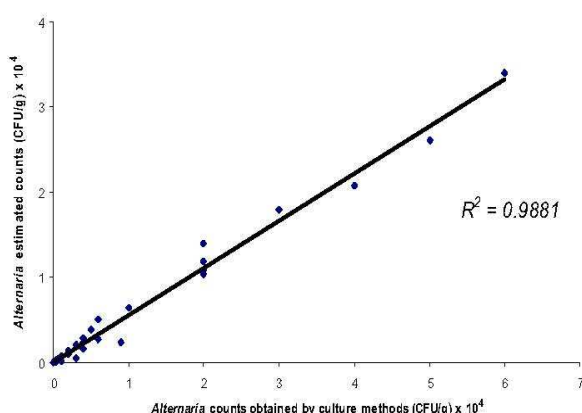


Fig. 5. Relationship between *Alternaria* counts estimated using the *Alternaria* spp. real-time RT-PCR system, and the counts obtained by culture methods (plating on Sabouraud-CAF, followed by identification in PCA) from commercial raw and processed vegetables and fruit samples.

- Andersen, B., Smedsgaard, J., Jorring, I., Skouboe, P., & Pedersen, L. H. (2006). Real-time PCR quantification of the AM-toxin gene and HPLC qualification of toxigenic metabolites from *Alternaria* species from apples. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 105–111.
- Andersen, B., Sorensen, J. L., Nielsen, K. F., van den Ende, B. G., & de Hoog, S. (2009). A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria* infectoria species-group. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 642–656.
- Barkai-Golan, R., & Paster, N. (2008). Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part I. *World Mycotoxin Journal*, 1, 147–159.
- Bell, P. J. L., Deere, D., Shen, J., Chapman, B., Bissinger, P. H., Attfield, P. V., et al. (1998). A flow cytometric method for rapid selection of novel industrial yeast hybrids. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1669–1672.
- Bensassi, F., Zid, M., Rhouma, A., Bacha, H., & Hajlaoui, M. R. (2009). First report of *Alternaria* species associated with black point of wheat in Tunisia. *Annals of Microbiology*, 59, 465–467.
- Bleve, G., Rizzoti, L., Dellaglio, F., & Torriani, S. (2003). Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yoghurts and pasteurized food products. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4116–4122.
- Bottalico, A., & Logrieco, A. (1998). Toxigenic species of economic importance. In K. K. Sinha, & D. Bhatnagar (Eds.), *Mycotoxins in agriculture and food safety* (pp. 65–108). New York, USA: Marcel Dekker Inc.
- Bustin, S., Benes, V., Garson, J., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 611–622.
- Diguta, C. F., Vincent, B., Guillaou-Benatier, M., Alexandre, H., & Rousseaux, S. (2011). PCR ITS-RFLP: a useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. *Food Microbiology*, 28, 1145–1154.
- Dorak, M. T. (2006). *Real-time PCR (advanced methods series)*. London: Taylor & Francis Group.
- Ellis, M. B., & Ellis, J. P. (1997). *Microfungi on land plants. An identification Handbook* (Enlarged ed.). England: The Richmond Publishing Co. Ltd.
- Giryn, H., & Szteke, B. (1995). Determination of *Alternaria* mycotoxins in selected raw and processed fruit and vegetable products. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 46, 129–133.
- González-Salgado, A., Patiño, B., Gil-Serna, J., Vázquez, C., & González-Jaén, M. T. (2009). Specific detection of *Aspergillus carbonarius* by SYBR® Green and TaqMan® quantitative PCR assays based on the multicopy ITS2 region of the rRNA gene. *FEMS Microbiology Letters*, 295, 57–66.
- Guillemette, T., Iacomini, B., & Simoneau, P. (2004). Conventional and real-time PCR-based assay for detecting pathogenic *Alternaria brassicae* in Cruciferous seed. *Plant Disease*, 88, 490–496.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., González, A., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2006). Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7148–7155.
- Hong, S. G., Cramer, R. A., Lawrence, C. B., & Pryor, B. M. (2005). Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genetics and Biology*, 42, 119–129.
- Iniesta, M. D., Pérez-Conesa, D., García-Alonso, J., Ros, G., & Periago, M. J. (2009). Folate content in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Influence of cultivar, ripeness, year of harvest, and pasteurization and storage temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4739–4745.
- Jackson, L. S., & Al-Tajer, F. (2008). Factors affecting mycotoxin production in fruits. In R. Barkai-Golan, & N. Paster (Eds.), *Mycotoxins in fruits and vegetables* (pp. 75–104). San Diego, USA: Elsevier Scientific Publishers.
- Jahn, B., Rampp, A., Dick, C., Jahn, A., Palmer, M., & Bhakdi, S. (1998). Accumulation of amphotericin B in human macrophages enhances activity against *Aspergillus fumigatus* conidia: quantification of conidial kill at the single-cell level. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 2569–2575.
- Kappe, R., Okeke, N., Fauser, C., Mainwald, M., & Sonntag, H. G. (1998). Molecular probes for the detection of pathogenic fungi in the presence of human tissue. *Journal of Medical Microbiology*, 47, 811–820.
- Konstantinova, P., Bonants, P., van Gent-Pelzer, M., van der Zouwen, P., & van den Bulk, R. (2002). Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. *Mycological Research*, 106, 23–33.
- Li, S., Marquardt, R. R., & Abramson, D. (2000). Immunochemical detection of molds: a review. *Journal of Food Protection*, 63, 281–291.
- Liu, G., Qian, Y., Zhang, P., Dong, W., Qi, Y., & Guo, H. (1992). Etiological role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer. *Chinese Medical Journal*, 105, 394–400.
- Logrieco, A., Moretti, A., & Solfrizzo, M. (2009). *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*, 2, 129–140.
- Mayoral, M. B., Martín, R., Hernández, P. E., González, I., & García, T. (2006). A reverse transcriptase PCR technique for the detection and viability assessment of *Kluyveromyces marxianus* in yoghurt. *Journal of Food Protection*, 69, 2210–2216.
- Melacrino, P., Zapparoli, G., Torriani, S., & Dellaglio, F. (2001). Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, 45, 127–134.
- Michaliszyn, E., Senechal, S., Martel, P., & de Repentigny, L. (1995). Lack of involvement of nitric oxide in killing of *Aspergillus fumigatus* conidia by pulmonary alveolar macrophages. *Infection and Immunity*, 63, 2075–2078.
- Ostry, V. (2008). *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*, 1, 175–188.
- Pavón, M. A., González, I., Pegels, N., Martín, R., & García, T. (2010). PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a 1. *Food Control*, 21, 1745–1756.
- Pavón, M. A., González, I., Rojas, M., Pegels, N., Martín, R., & García, T. (2011). PCR detection of *Alternaria* spp. in processed foods, based on the internal transcribed spacer genetic marker. *Journal of Food Protection*, 74, 240–247.
- Pavón, M. A., Luna, A., de la Cruz, S., González, I., Martín, R., & García, T. (2012). PCR-based assay for the detection of *Alternaria* species and correlation with HPLC determination of alternene, alternariol and alternariol monomethyl ether production in tomato products. *Food Control*, 25, 45–52.
- Pitt, J. I. (1980). *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. London: Academic Press.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (1997). *Fungi and food spoilage*. London: Blackie Academic and Professional.
- Pose, G., Patriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A., & Fernández, V. (2010). Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 348–353.
- Pryor, B., & Gilbertson, R. L. (2000). Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research*, 104, 1312–1321.
- Pryor, B. M., & Michailides, T. J. (2002). Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology*, 92, 406–416.
- Sheridan, G. E. C., Masters, C. I., Shallcross, J. A., & Mackey, B. M. (1998). Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1313–1318.
- Siegel, D., Feist, M., Proske, M., Koch, M., & Nehls, I. (2010). Degradation of the *Alternaria* mycotoxins alternariol, alternariol monomethyl ether, and alternene upon bread baking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9622–9630.
- Simmons, E. G. (1992). *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. In J. Chelkowski, & A. Visconti (Eds.), *Alternaria: Biology, plant diseases and metabolites* (pp. 1–36). Amsterdam: Elsevier Scientific Publishers.
- Simmons, E. G. (2007). *Alternaria. An identification manual*. Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre.
- Solfrizzo, M., de Girolamo, A., Vitti, C., Visconti, A., & van den Bulk, R. (2004). Liquid chromatographic determination of *Alternaria* toxins in carrot. *Journal of AOAC International*, 87, 101–106.
- Somma, S., Pose, G., Pardo, A., Mule, G., Fernandez, V., Moretti, A., et al. (2011). AFLP variability, toxin production, and pathogenicity of *Alternaria* species from Argentinean tomato fruits and puree. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 414–419.
- Sung, K., Hiett, K., & Stern, N. (2005). Heat-treated *Campylobacter* spp. and mRNA stability as determined by reverse transcriptase–polymerase chain reaction. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2, 130–137.
- Terminiello, L., Patriarca, A., Pose, G., & Fernández, V. (2006). Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean tomato puree. *Mycotoxin Research*, 22, 236–240.
- Tylkowska, K. (1992). Carrot seed-borne diseases caused by *Alternaria* species. In J. Chelkowski, & A. Visconti (Eds.), *Alternaria: Biology, plant diseases and metabolites* (pp. 337–352). Amsterdam: Elsevier Scientific Publishers.
- Vaitilingom, M., Gendre, F., & Brignon, P. (1998). Direct detection of viable bacteria, molds and yeasts by reverse transcriptase PCR in contaminated milk samples after heat treatment. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1157–1160.
- Zur, G., Shimon, E. M., Hallerman, E., & Kashi, Y. (2002). Detection of *Alternaria* fungal contamination in cereal grains by a polymerase chain reaction-based assay. *Journal of Food Protection*, 65, 1433–1440.



*CAPÍTULO IV*  
*Resultados y Discusión*

---



#### IV.1. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LAS CEPAS FÚNGICAS

El desarrollo de métodos para la detección de *Alternaria* spp. en alimentos exige disponer de un número aceptable de cepas de *Alternaria* así como de otras especies fúngicas aisladas de alimentos. Para ello se utilizaron cepas fúngicas procedentes de distintas Colecciones de Cultivos Tipo, preferentemente aisladas de matrices alimentarias (Tabla 8). Las cepas fúngicas procedentes de colecciones de cultivos se sembraron en placas que contenían agar extracto de malta (MEA) y se incubaron a 25 °C durante 7 días. Además, las cepas de *Alternaria* se sembraron en placas de agar patata dextrosa (PDA), que se incubaron en las mismas condiciones que las anteriores, y en placas de agar patata zanahoria (PCA), las cuales se incubaron a 25 °C con alternancia de luz (12 horas de luz y 12 de oscuridad) durante 7 días. El análisis morfológico y del modelo de esporulación mediante microscopio y estereomicroscopio permitió confirmar la identidad de las cepas fúngicas procedentes de las colecciones (Ellis y Ellis, 1997; Samson y col., 2004; Samson y Frisvad, 2004; Simmons, 2007).

Para conseguir el aislamiento de cepas de *Alternaria* a partir de alimentos, se sembraron muestras de manzana, pera, ciruela, tomate, rama de tomate, judías verdes, coles de Bruselas, cebolla, avellana, granos de trigo y zanahoria, previamente desinfectadas con hipoclorito sódico al 0,4 %, en agar V-8 (zumo vegetal, Campbell), PDA, MEA, PCA, PCA con cicloheximi-

da (PCA-c) y PCA con manganeso (PCA-Mn, Sorensen y col., 2009). Las placas sembradas se incubaron a 25 °C durante 7 días. Al analizar las características morfológicas y fisiológicas de los hongos que se desarrollaron en los diferentes medios, se observó el crecimiento de especies pertenecientes a los géneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chalaropsis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhizopus* y *Trichoderma* (Tabla 9, Figura 6) (Ellis y Ellis, 1997; Samson y col., 2004; Samson y Frisvad, 2004; Simmons, 2007). Únicamente se aislaron cepas de *Alternaria* a partir de los granos de trigo y las ramas de tomate sembradas en los medios PCA-c y PCA-Mn. Se aislaron 11 cepas de *Alternaria* (diez a partir de los granos de trigo y una de las ramas de tomate) y, con ayuda del estereomicroscopio y microscopio, se clasificaron en tres grupos (*A. arborescens*, *A. infectoria* y *A. tenuissima*) según el modelo de esporulación y las características morfológicas (Tabla 9, Figura 7) (Andersen y col., 2002; Simmons, 2007). La cepa de *Alternaria* aislada a partir de las ramas de tomate no se pudo clasificar en ningún grupo, ya que se observó la presencia simultánea de dos tipos de esporulación y, por lo tanto, dos especies de *Alternaria* diferentes.

#### IV.2. DESARROLLO DE TÉCNICAS GENÉTICAS DE PCR CON CEBADORES ESPECÍFICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *ALTERNARIA* SPP.

La metodología convencional utilizada para la identificación de mohos en los alimentos se basa en la siembra de las muestras en placas de agar selectivo. Sin



**Tabla 8.** Cepas fúngicas de referencia utilizadas en este trabajo.

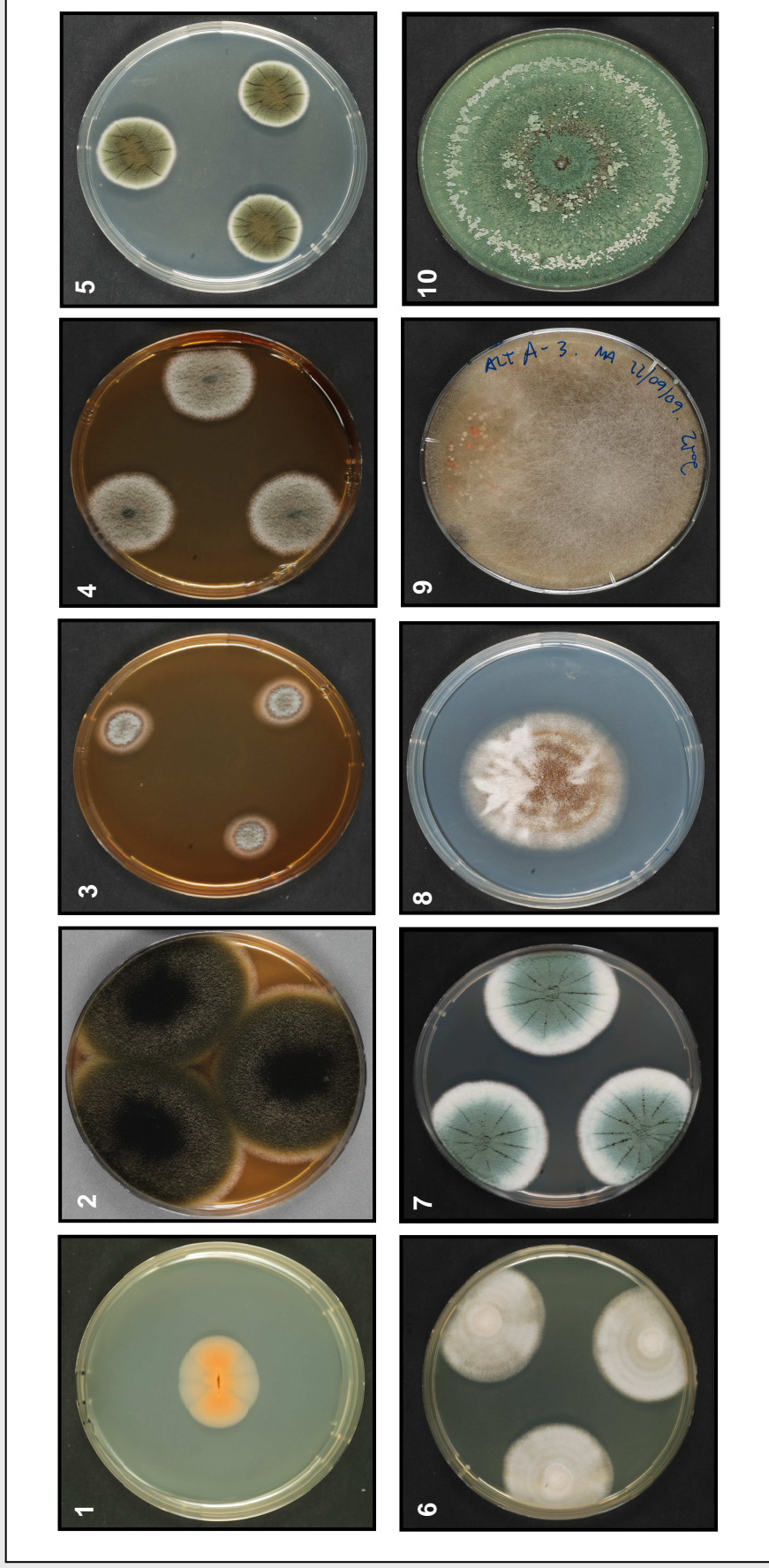
Especie	Referencia de la colección	Origen
<i>Alternaria alternata</i>	CBS 154.31 <sup>a</sup>	<i>Staphylea trifolia</i>
	CBS 117130	<i>Arbutus unedo</i> (árbol)
	CBS 117143	<i>Capsicum annuum</i> (fruto)
<i>A. arborescens</i>	CBS 109730	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>A. citri</i>	CBS 192.81	<i>Citrus sinensis</i> (fruto)
<i>A. dauci</i>	CBS 101592	<i>Daucus carota</i> (semilla)
<i>A. gaisen</i>	CBS 632.93	<i>Pyrus pyrifolia</i> (hoja)
<i>A. infectoria</i>	CBS 210.86	<i>Triticum</i>
<i>A. longipes</i>	CBS 917.96	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>A. porri</i>	CBS 109.41	- <sup>d</sup>
<i>A. radicina</i> var. <i>radicina</i>	CBS 245.67	<i>Daucus carota</i>
<i>A. solani</i>	CBS 347.79	<i>Lycopersicon esculentum</i> (fruto)
<i>A. tenuissima</i>	CBS 880.95	<i>Fragaria vesca</i>
<i>Aspergillus ochraceus</i>	MUCL 14207 <sup>b</sup>	<i>Coffea robusta</i> (cotiledón)
<i>Fusarium oxysporum</i>	CECT 2866 <sup>c</sup>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>Penicillium expansum</i>	CECT 2278	Embutido enmohecido
<i>Rizopus stolonifer</i>	CECT 2344	-

<sup>a</sup> CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Holanda<sup>b</sup> MUCL: Mycothèque de l'Université catholique de Louvain, Bélgica<sup>c</sup> CECT: Colección Española de Cultivos Tipo<sup>d</sup> -: Sin información sobre el origen de la cepa

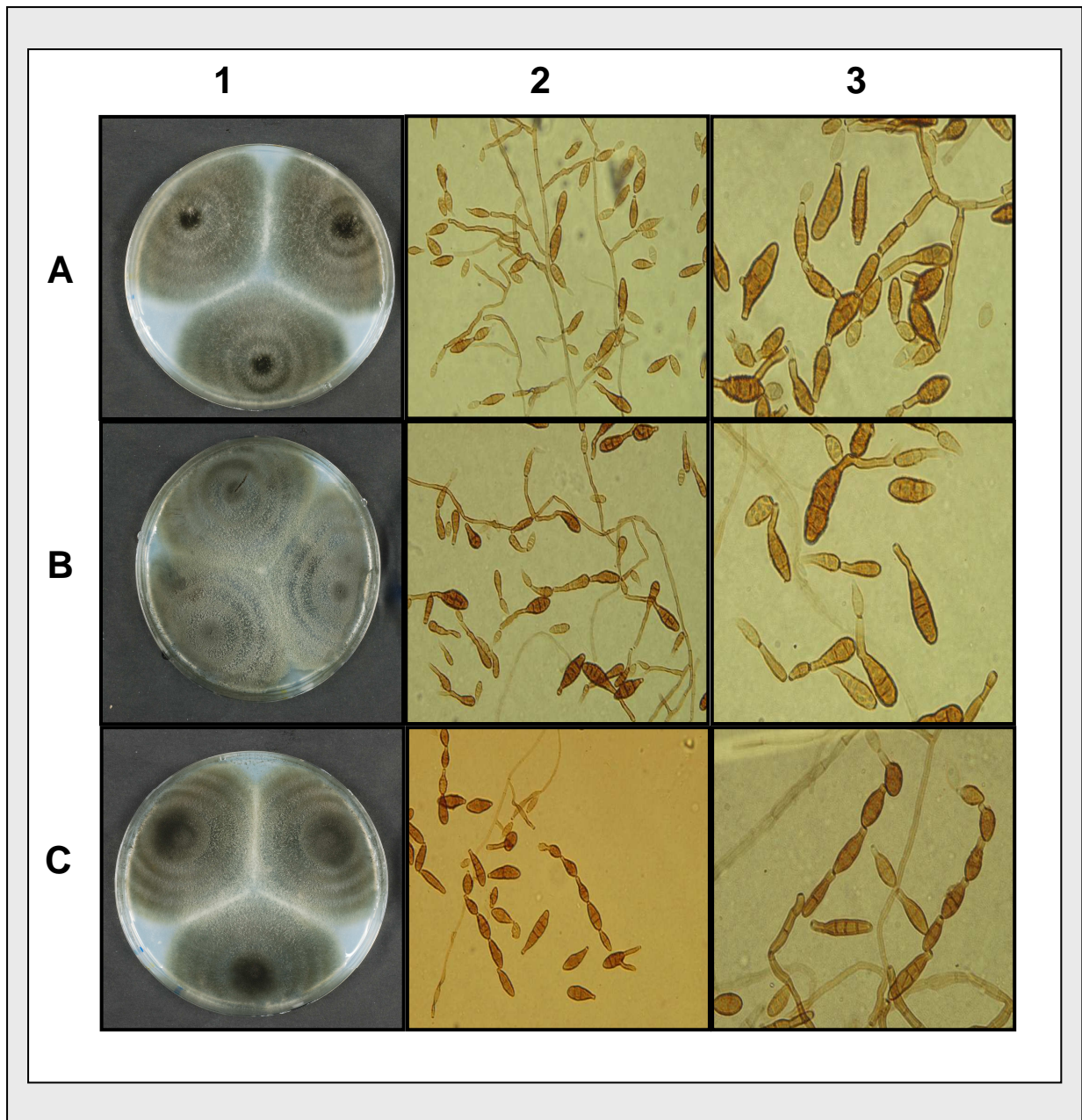
**Tabla 9.** Mohos aislados a partir de los alimentos analizados.

Alimento	Especie (cepa)
Avellana	<i>Rhizopus</i> spp.
	<i>Penicillium brevicompactum</i>
Cebolla	<i>Fusarium oxysporum</i>
Ciruela	<i>Penicillium expansum</i>
Coles de Bruselas	<i>Rhizopus</i> spp.
Judías verdes	<i>Acremonium</i> spp.
	<i>Aspergillus versicolor</i>
	<i>Cladosporium cladosporoides</i>
	<i>Cladosporium fusiforme</i>
	<i>Penicillium digitatum</i>
Manzana	<i>Acremonium</i> spp.
	<i>Cladosporium cladosporoides</i>
Pera	<i>Cladosporium cladosporoides</i>
	<i>Phoma</i> spp.
	<i>Trichoderma harzianum</i>
Rama de tomate	<i>Alternaria</i> spp.
Tomate (fruto)	<i>Penicillium olsonii</i>
Granos de Trigo	grupo <i>Alternaria arborescens</i> (MAP05)
	grupo <i>Alternaria infectoria</i> (MAP03, MAP04, MAP08)
	grupo <i>Alternaria tenuissima</i> (MAP01, MAP02, MAP06, MAP07, MAP09, MAP10)
Zanahoria	<i>Chalaropsis thielavioides</i>
	<i>Fusarium avenaceum</i>
	<i>Penicillium brevicompactum</i>
	<i>Penicillium glabrum</i>





**Figura 6.** Cepas fúngicas aisladas en este trabajo a partir de muestras de alimentos, inoculadas en MEA o PDA: *Acremonium* en PDA (1), *Alter-naria* en MEA (2), *Aspergillus* en MEA (3), *Chalaropsis* en MEA (4), *Cladosporium* en PDA (5), *Fusarium* en PDA (6), *Penicillium* en PDA (7), *Phoma* en PDA (8), *Rhizopus* en MEA (9) y *Trichoderma* en PDA (10).



**Figura 7.** Cepas de *A. arborescens* (A), *A. infectoria* (B) y *A. tenuissima* (C) aisladas de granos de trigo. Cepas inoculadas en PCA (1). Conidióforos y conidias a 200x (2) y 400x (3).

embargo, actualmente, las técnicas basadas en el análisis del ADN constituyen una estrategia atractiva para la detección e identificación de especies fúngicas en alimentos, ya que son rápidas y permiten detectar tanto los mohos viables como los inactivados por los tratamientos tecnológicos empleados en la elaboración de los alimentos.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido, con diferencia, la herramienta que ha permitido una mayor expansión de las técnicas genéticas. Hasta su descubrimiento en la década de 1980, la única forma de obtener un determinado fragmento de ADN en cantidad suficiente para su análisis era seguir laboriosos y lentos procedimientos de clonación. La técnica de PCR, sin embargo, permite obtener millones de copias de una secuencia específica de ADN mediante una simple reacción enzimática. Por ello, esta técnica ha causado un profundo impacto en todas las áreas de investigación biológica y biomédica y se emplea en multitud de aplicaciones: diagnóstico de enfermedades genéticas y hereditarias, detección de infecciones microbianas, estudios de evolución molecular, medicina forense, identificación de especies y detección de microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos (Klingspor y Jalal, 2006; Sevilla y col., 2007; Lu y col., 2008; Rantsiou y col., 2008).

Las técnicas de PCR se han empleado con éxito en la identificación de diferentes géneros y especies fúngicas presentes en los alimentos, bien de forma directa (Sardiñas y col., 2011; Ben Amar y col., 2012; Luque y col., 2012), o complementada con

otras técnicas como la secuenciación (García y col., 2006; Bensassi y col., 2009; Moretti y col., 2010; Kim y col., 2011), el análisis del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD) (Pryor y Michaliades, 2002; Sánchez y col., 2008; Dachoupakan y col., 2009; Gashgari y col., 2011), el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP) (Somashekar y col., 2004; Lozynska y col., 2010; Fernández-Ortuño y col., 2011) o el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) (Perrone y col., 2006; Cipriani y col., 2009; Somma y col., 2010, 2011), entre otras.

Se han desarrollado técnicas de PCR para la detección e identificación en alimentos de especies toxigénicas de *Aspergillus* (González-Salgado y col., 2008; Selma y col., 2008; Gil-Serna y col., 2009; Moslem y col., 2010; Castellá y Cabañes, 2011; Rodríguez y col., 2011; Spadaro y col., 2011; Luque y col., 2012), *Fusarium* (Lincy y col., 2008; Sreenivasa y col., 2008; Yin y col., 2009; Fredlund y col., 2010; Sampietro y col., 2010; Kulik y col., 2011; Atoui y col., 2012) y *Penicillium* (Bogs y col., 2006; Dombink-Kurtzman y McGovern, 2007; Schmidt-Heydt y col., 2008; Suanthie y col., 2009; Rodríguez y col., 2012). En el caso de *Alternaria* spp., son numerosos los estudios genéticos dirigidos a la clasificación filogenética de *Alternaria* spp. (Pryor y Gilbertson, 2000, 2002; Roberts y col., 2000; Chou y Wu, 2002; de Hoog y Horre, 2002; Peever y col., 2002; Pryor y Michailides, 2002; Cramer y Lawrence, 2003; Hong y col., 2005; Dini-Andreote y col., 2009). Sin embargo, son

escasas las publicaciones existentes hasta el momento en el área de la detección de *Alternaria* spp. en alimentos frescos y procesados mediante técnicas genéticas (Zur y col., 1999, 2002; Guillemette y col., 2004; Andersen y col., 2006; Somma y col., 2011). Por ello, este trabajo de investigación se ha centrado en la puesta a punto de diversas técnicas genéticas (PCR convencional, PCR en tiempo real y RT-PCR en tiempo real) para la detección e identificación de especies de *Alternaria* en alimentos. Asimismo, se ha desarrollado una técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la detección de AOH, AME y ALT en productos hortofrutícolas frescos y procesados. A continuación, se analizan los resultados más relevantes alcanzados en cada uno de los objetivos planteados.

#### **Detección de *Alternaria* spp. mediante técnicas de PCR empleando los marcadores genéticos ITS y *Alt a 1***

El primer objetivo de este trabajo de investigación consistió en el desarrollo de técnicas de PCR con cebadores específicos para la detección de *Alternaria* spp. Para ello fue necesario seleccionar marcadores genéticos con un grado de variabilidad interespecífica adecuado (Abebe y col., 2006).

El ADN ribosómico constituye una diana idónea para la localización de secuencias específicas de especie, debido a que posee regiones con diferentes grados de variabilidad intra e interespecífica, suficientes para diferenciar géneros, especies o cepas de una misma especie. Además, cada célula posee un número elevado de copias de genes ribosómicos. Esta última caracte-

rística es importante cuando el material genético de partida es muy escaso o se encuentra degradado. Los marcadores ribosómicos más utilizados para la detección de mohos toxigénicos en alimentos han sido los espaciadores internos de la transcripción ITS1 e ITS2 (Zur y col., 1999; Konstantinova y col., 2002; González-Salgado y col., 2008; Midorikawa y col., 2008; Luo y col., 2009; Suanthie y col., 2009; Xie y col., 2010; Wang y col., 2010; Diguta y col., 2011; Li y col., 2011; Ramana y col., 2011) y el espaciador intergénico (IGS) (Llorens y col., 2006; Kulik, 2008; Diguta y col., 2010; Yli-Mattila y col., 2011; Ben Amar y col., 2012).

A pesar de que la mayoría de los estudios de identificación de especies fúngicas han empleado ADN ribosómico, en el caso del género *Alternaria* también se han utilizado genes nucleares de una sola copia específicos de género, como el gen *Alt a 1*, que codifica el principal alérgeno de *A. alternata* (*Alt a 1*) y de otras especies de este género (Cramer y Lawrence, 2003; Hong y col., 2005; Park y col., 2008) y el gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gpd*) (Hong y col., 2005; Park y col., 2008; Andersen y col., 2009).

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, para la detección de especies de *Alternaria* por PCR se consideró conveniente seleccionar marcadores genéticos con regiones conservadas entre las especies del género *Alternaria*, con el fin de poder amplificar un fragmento homólogo en todas ellas. Tras la búsqueda bibliográfica y el posterior estudio de secuencias disponibles en la base de datos *Genbank/EMBL* (*European Molecu-*



lar Biology Laboratory), los marcadores elegidos fueron el espaciador interno de la transcripción (ITS) y el gen *Alt a 1*.

Los cebadores para la detección específica del género *Alternaria* se diseñaron a partir de la alineación y análisis informático de las secuencias de los genes de interés disponibles en la base de datos *GenBank/EMBL*. En el ADN ribosómico se diseñaron los cebadores Dir1ITSAlt e Inv1ITSAlt que hibridan, respectivamente, en regiones específicas del ITS1 e ITS2 de las especies de *Alternaria* y delimitan un fragmento de 370 pb del ARNr de este género. Para la amplificación del gen *Alt a 1* se diseñaron los cebadores Dir3Alta1 e Inv4Alta1, que delimitan un fragmento de 350 pb en todas las especies de *Alternaria*. El diseño de esta pareja de cebadores se realizó con el fin de obtener un mayor número de secuencias del gen *Alt a 1*, ya que su disponibilidad en la base de datos es escasa. La utilización de marcadores genéticos de una sola copia, como es el gen *Alt a 1*, puede representar un inconveniente para el análisis de muestras tratadas térmicamente, debido a la posible degradación del ADN de *Alternaria* spp. durante el tratamiento. Por este motivo, para aumentar la eficiencia de la técnica desarrollada se diseñó un nuevo cebador, Dir5cAlta1, que combinado con el Inv4Alta1, delimita un fragmento de 195 pb.

Un problema que puede afectar a los protocolos de PCR deriva de posibles fallos en la amplificación del ADN como consecuencia de la presencia de sustancias inhibidoras en las muestras. El fenómeno de inhibición puede disminuir o incluso impedir

por completo la amplificación por PCR, dando lugar a falsos resultados negativos (Wilson, 1997). En este sentido, el Comité Europeo de Estandarización, en colaboración con la ISO (Organización Internacional para la Normalización), ha propuesto unas pautas generales para los ensayos de PCR que incluyen el requerimiento de utilizar un control interno en cada reacción de PCR que evite una interpretación errónea de aquellos resultados de ausencia de amplificación que puedan deberse a fenómenos de inhibición (Lund y Madsen, 2006). Teniendo en cuenta estas recomendaciones, todas las muestras analizadas con los cebadores específicos se examinaron simultáneamente con la pareja de cebadores conservados 18SFwEu y 18SRvEu (Martín y col., 2009), que amplifican un fragmento de 99 pb del gen nuclear 18S ARNr en todos los organismos eucariotas.

Tras comprobar la idoneidad de la amplificación de los fragmentos de 350 y 370 pb con las parejas de cebadores Dir3Alta1/Inv4Alta1 y Dir1ITSAlt/Inv1ITSAlt, respectivamente, se purificaron y secuenciaron los amplicones obtenidos a partir del ADN extraído de las cepas de *Alternaria* utilizadas en este trabajo. Las secuencias obtenidas se registraron en la base de datos *Genbank/EMBL* (Tabla 1, pág. 74, para las secuencias del gen *Alt a 1*; Tabla 1, pág. 86, para las secuencias del ITS). El registro de estas secuencias en la base de datos es importante, puesto que para muchas de las especies objeto de estudio no se disponía de secuencias del gen *Alt a 1* registradas previamente, o bien estas eran escasas.

Las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en la base de datos Genbank/EMBL, utilizando el programa BLAST del paquete informático NCBI (National Center for Biotechnology Information). Además, se realizó un análisis filogenético de las secuencias obtenidas junto con las disponibles en la base de datos Genbank/EMBL para el ITS y el gen *Alt a 1*. El análisis de las secuencias confirmó la identidad de las cepas de *Alternaria* analizadas. Además, el estudio filogenético permitió diferenciar cuatro grupos de especies de *Alternaria* (Figura 2, pág. 89, para el ITS; no se muestran los resultados para el *Alt a 1*). El primer grupo, comprendía las secuencias de especies pertenecientes al grupo de *A. alternata*. El segundo grupo incluía las especies pertenecientes al grupo de *A. radicina*. El tercer grupo, estaba formado por las secuencias de las especies pertenecientes al grupo de *A. porri*. Por último, en el cuarto grupo, se incluían las secuencias de especies pertenecientes al grupo de *A. infectoria*. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros investigadores, donde las especies de *Alternaria* utilizadas en este trabajo se agrupan en cuatro grupos principales: *A. alternata*, *A. infectoria*, *A. radicina* y *A. porri* (Pryor y Gilbertson, 2000; Cramer y Lawrence, 2003; Hong y col., 2005).

La especificidad de los cebadores diseñados se comprobó mediante el análisis del ADN extraído de 23 cepas de *Alternaria*, correspondientes a 11 especies de este género, así como de diversas especies fúngicas pertenecientes a otros géneros, levaduras, bacterias, animales y plantas. Las parejas de cebadores diseñadas demostraron ser

específicas frente a *Alternaria* spp., no originando bandas de amplificación a partir del ADN de otras especies fúngicas, levaduras, bacterias, animales y plantas (Figura 2, pág. 77, para los cebadores Dir5cAlta1 e Inv4Alta1 diseñados en el gen *Alt a 1*; Figura 1, pág. 88, para los cebadores Dir1ITSAlt e Inv1ITSAlt diseñados en el ITS).

Las técnicas de PCR desarrolladas con estos cebadores detectan todas las especies de *Alternaria*, a diferencia del trabajo desarrollado por Zur y col. (2002), en el que solo se detectaba específicamente *A. alternata* y *A. solani* en granos de cereales utilizando cebadores diseñados en el ITS. Por otra parte, Konstantinova y col. (2002) desarrollaron una técnica de PCR utilizando cebadores especie-específicos diseñados en el ITS, para la detección de *A. alternata*, *A. radicina* y *A. dauci* en zanahorias, ya que son las especies aisladas principalmente en este tipo de alimentos. Otros investigadores como Zur y col. (1999), diseñaron cebadores en el ITS para la detección específica de *Alternaria* spp. en tomate y derivados. Sin embargo, en su trabajo solo utilizaron el ADN de una cepa de *A. alternata* para evaluar la especificidad de los cebadores diseñados.

La utilización de los cebadores universales 18SFwEu/18SRvEu, en una técnica de PCR múltiple junto con cada una de las parejas de cebadores específicos del género *Alternaria*, produjo la amplificación de un fragmento de 99 pb a partir del ADN de todas las especies de organismos eucariotas analizadas y no interfirió en la amplificación del fragmento específico de *Alternaria* spp.



(Figura 2, pág. 77, con los cebadores diseñados en el *Alt a 1*; Figura 1, pág. 88, con los cebadores diseñados en el ITS).

Una vez demostrada la correcta amplificación del ADN de *Alternaria* spp. a partir de cultivos viables, el límite de detección y la influencia de los tratamientos térmicos en la capacidad del método para detectar *Alternaria* spp. se evaluó mediante el análisis, en paralelo, de diluciones decimales de cultivos viables de *A. alternata*, *A. radicina*, *A. porri* y *A. infectoria* y los mismos cultivos sometidos a tratamientos térmicos de 60 °C durante 30 min y 90 °C durante 5 min. La influencia de una matriz vegetal en la sensibilidad de la técnica de PCR para detectar *Alternaria* spp. se comprobó mediante el análisis de muestras de pulpa de tomate inoculadas con diluciones de cada uno de los cultivos viables e inactivados por calor. El límite de detección de *A. alternata* con los cebadores Dir5cAlta1/Inv4Alta1 (Figura 4, pág. 79) y Dir1ITSAlt/Inv1ITSAlt (Figuras 3A y B, pág. 89) fue de  $10^2$  UFC/mL, tanto en el cultivo viable como en los inactivados por calor a 60 °C/30 min (no se muestran los resultados para los cebadores diseñados en el ITS) o 90 °C/5 min. La presencia de una matriz vegetal (pulpa de tomate) tampoco alteró el límite de detección. De forma similar a lo expuesto para *A. alternata*, el límite de detección de la técnica con los dos marcadores genéticos fue de  $10^2$  UFC/mL, tanto en los cultivos de *A. radicina*, *A. porri* y *A. infectoria*, como en pulpa de tomate, y no se vio afectado por los tratamientos térmicos empleados (Figura 3C-H, pág. 89, para el ITS; no se muestran los resultados para el *Alt a 1*). Los resultados demuestran que las técni-

cas de PCR desarrolladas son capaces de detectar la presencia de bajas concentraciones de *Alternaria* spp., incluso en muestras sometidas a tratamientos térmicos. El límite de detección obtenido con los dos marcadores genéticos,  $10^2$  UFC/mL, no se puede comparar con los obtenidos por otros investigadores para la detección de especies de *Alternaria* con PCR convencional. Zur y col. (1999, 2002) establecieron el límite de detección de las técnicas de PCR desarrolladas mediante el análisis de muestras de alimentos inoculadas con diluciones de cultivos de *Alternaria* spp. Sin embargo, en dichos trabajos no se determinaron los recuentos de *Alternaria* spp. presentes en los cultivos. Por otra parte, Konstantinova y col. (2002) determinaron el límite de detección de la técnica de PCR a partir de diluciones de ADN, obteniendo límites de detección entre 0,5 y 1 ng, pero tampoco establecieron la relación con recuentos fúngicos.

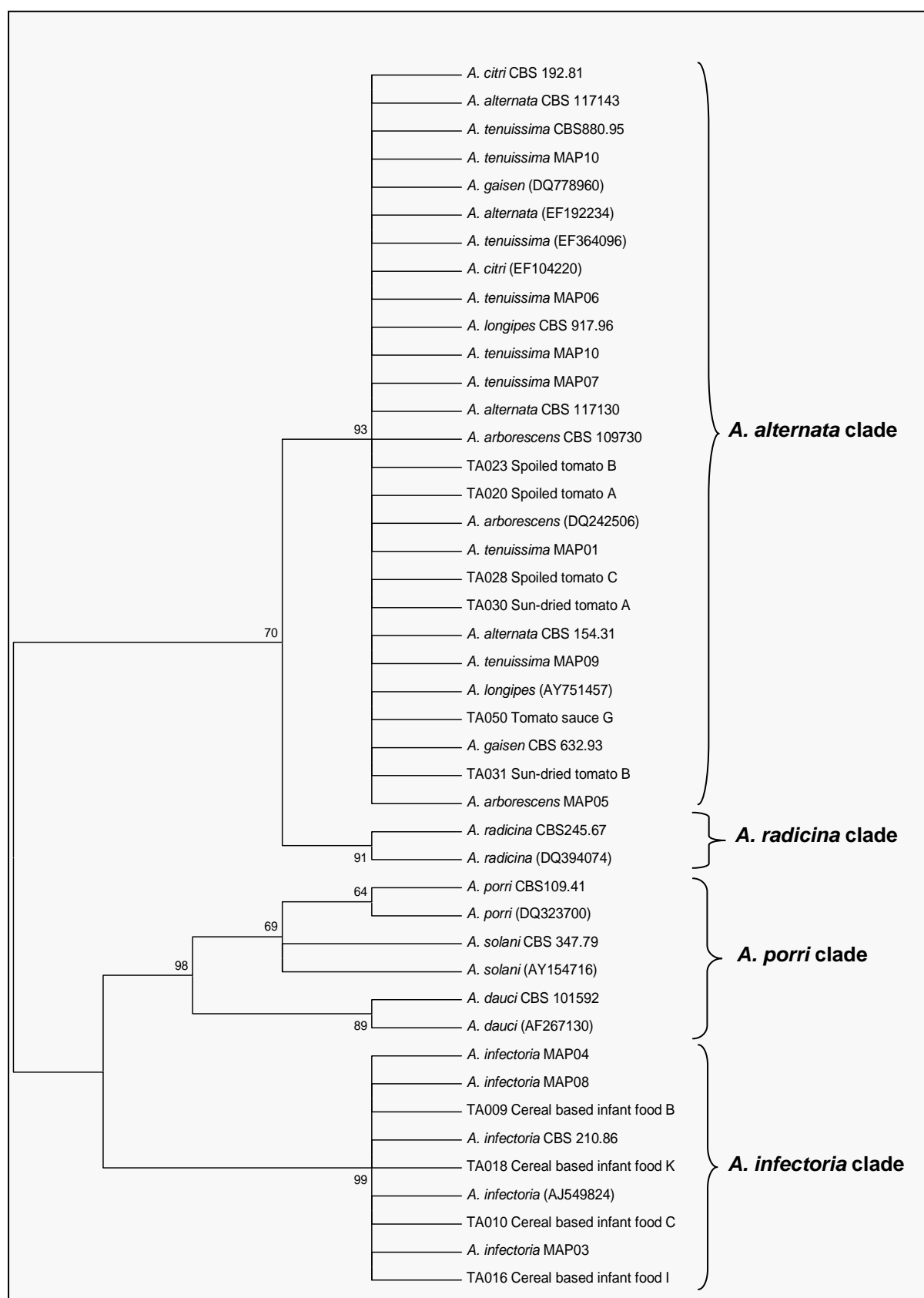
La aplicabilidad de las técnicas de PCR desarrolladas se determinó mediante el análisis de 48 muestras comerciales de tomate fresco y procesado, incluyendo 11 muestras de tomate fresco, tres de las cuales eran tomates con podredumbre y ocho tomates sanos, y 37 productos comerciales de tomate, de los que 6 muestras eran de tomate seco, 7 de ketchup, 10 de conservas de tomate (entero, triturado, etc.) y 14 salsas de tomate. Asimismo, se analizaron 11 muestras de papillas de cereales. El análisis con las parejas de cebadores Dir5cAlta1/Inv4Alta1 y Dir1ITSAlt/Inv1ITSAlt demostró la presencia de ADN de *Alternaria* spp. en 10 de las 59 muestras analizadas (17 %), correspondientes a 4 papillas de

cereales, 3 tomates alterados, 2 tomates desecados y una salsa de tomate (Tabla 3, pág. 82, para el *Alt a 1*; Tabla 2, pág. 90, para el ITS). Conviene señalar que las muestras de productos comerciales en las que no se obtuvo amplificación con las parejas de cebadores específicos, sí se amplificaron correctamente con los cebadores empleados como control positivo de amplificación, lo que demuestra que los resultados negativos con los cebadores específicos no se deben a la presencia de inhibidores o a la degradación del ADN, sino a la ausencia de ADN de *Alternaria* spp.

La presencia de mohos y levaduras viables en las muestras analizadas se determinó mediante la siembra en Sabouraud-CAF, obteniéndose recuentos de  $10^3$  UFC/g en todas las muestras de tomate alterado analizadas y recuentos de  $10^2$  UFC/g a partir de las muestras de tomate desecado positivas por PCR. La presencia de mohos viables en las muestras de tomate desecado demuestra que los métodos tradicionales de secado de tomates ofrecen condiciones ambientales apropiadas para el crecimiento fúngico y la posible producción de micotoxinas. El resto de muestras de tomate fresco y procesado, así como las muestras de papillas de cereales produjeron resultados negativos en el recuento de mohos.

La detección de ADN de *Alternaria* spp. en 10 de las muestras analizadas podría indicar una contaminación de dichas muestras con alguna especie de este género. Para comprobar esta hipótesis, se purificaron y secuenciaron las bandas de amplificación obtenidas a partir del ADN de las

cuatro papillas de cereales, los 3 tomates alterados, los 2 tomates desecados y la salsa de tomate. Las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en la base de datos *Genbank/EMBL*, utilizando el programa BLAST del paquete informático NCBI. Además, se incluyeron las secuencias obtenidas a partir de las muestras, junto con las secuencias del ITS y del gen *Alt a 1* de cepas de *Alternaria* de referencia y las disponibles en la base de datos *Genbank/EMBL* para realizar un análisis filogenético (Figura 6, pág. 83, para el *Alt a 1*; Figura 8, para el ITS). El análisis de las secuencias demostró que el ADN amplificado a partir de las seis muestras de tomate correspondía a especies del grupo de *A. alternata*, mientras que el ADN amplificado a partir de las muestras de papillas de cereales correspondía a especies del grupo de *A. infectoria*. Por otra parte, el análisis filogenético permitió agrupar las secuencias obtenidas a partir de las muestras de tomate fresco y procesado con las de especies pertenecientes al grupo de *A. alternata*, mientras que las secuencias obtenidas a partir de las muestras positivas de papillas de cereales se agruparon junto con las de las especies pertenecientes al grupo de *A. infectoria*. Por lo tanto, el análisis filogenético de las secuencias obtenidas con las parejas de cebadores diseñadas en el ITS y el gen *Alt a 1*, y su comparación con las secuencias disponibles en la base de datos, permitieron realizar una clasificación adecuada de las diferentes especies de *Alternaria* aisladas de las muestras analizadas y fueron coincidentes utilizando los dos marcadores genéticos.



**Figura 8.** Árbol filogenético elaborado a partir de secuencias del ITS de cepas de *Alternaria* de referencia y las obtenidas con los cebadores Dir1ITSAlt/Inv1ITSAlt a partir de las muestras comerciales de alimentos. Los códigos entre paréntesis indican el número de acceso de las secuencias en la base de datos *GenBank/EMBL*.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que las técnicas de PCR convencional desarrolladas constituyen una herramienta útil para la detección de *Alternaria* spp. en productos hortofrutícolas frescos y procesados, por lo que podrían emplearse como marcadores de calidad y bioseguridad de materias primas y productos elaborados en las industrias de transformación de vegetales.

#### **Diferenciación de grupos de especies del género *Alternaria* mediante una técnica de PCR empleando el marcador genético *Alt a 1***

La clasificación de las especies de *Alternaria* es compleja, y puede atender a diversos criterios fenotípicos y genotípicos. Sin embargo, diferentes estudios filogenéticos (Chou y Wu, 2002; Hong y col., 2005) agrupan las especies de *Alternaria* en cuatro grupos principales:

- 1) El grupo de *A. alternata* engloba las principales especies del género (*A. alternata*, *A. arborescens*, *A. tenuissima*, *A. gaisen*, *A. citri* y *A. longipes*) productoras de micotoxinas como AOH, AME, ALT, TeA y ATX-I (Andersen y col., 2001, 2002), por lo que su identificación en las materias primas vegetales y productos transformados reviste especial interés.
- 2) El grupo de *A. porri* incluye especies como *A. solani*, *A. porri*, *A. dauci* y *A. tomatophila*, causantes de pérdidas económicas importantes en agricultura por su carácter fitopatógeno. Algunas de estas especies producen además

micotoxinas como AOH, ATX y altersolanol (Andersen y col., 2008).

- 3) El grupo de *A. radicina* comprende especies patógenas de cultivos de umbelíferas como la zanahoria y que producen fitotoxinas como la radicinina y el radicinol (Tylkowska, 1992; Konstantinova y col., 2002; Solfrizzo y col., 2005).
- 4) El grupo de *A. infectoria* se aísla con frecuencia de cereales y produce metabolitos como las infectopironas y novae-zelandinas, sintetizados únicamente por especies de este grupo (Christensen y col., 2005; Andersen y col., 2009).

Disponer de técnicas genéticas rápidas capaces de diferenciar los grupos de especies de *Alternaria* es importante para la detección precoz de especies fitopatógenas en cultivos sensibles y el establecimiento de medidas preventivas y correctoras con el fin de reducir las pérdidas económicas en el sector primario. Asimismo, la detección de especies de *Alternaria* productoras de micotoxinas en materias primas vegetales y productos transformados reviste especial interés desde el punto de vista de la protección de la salud de los consumidores. Por este motivo, la segunda parte de este trabajo de investigación consistió en la puesta a punto de una técnica de PCR múltiple con cebadores específicos para detectar y diferenciar las especies de *Alternaria* pertenecientes a los principales grupos del género.

El marcador genético empleado para llevar a cabo el diseño de cebadores específicos de grupo fue el gen *Alt a 1*. La alineación

ción y análisis informático de las secuencias del gen *Alt a 1* disponibles en la base de datos *GenBank/EMBL* permitió el diseño de parejas de cebadores para la amplificación de fragmentos de ADN específicos de las especies del grupo de *A. alternata* (118 pb), de *A. porri* (118 pb), de *A. radicina* (131 pb) y de *A. infectoria* (118 pb) (Figura 1, pág. 75; Tabla 2, pág. 76). Asimismo, con el fin de realizar simultáneamente la detección de *Alternaria* spp. y la identificación del grupo al que pertenece la especie detectada, se utilizó el cebador Dir3Alta1 en una técnica de PCR múltiple junto a los cebadores específicos de los distintos grupos de especies de *Alternaria*.

El tamaño de los amplicones obtenidos en cada grupo de especies coincidió con el esperado según el estudio de las secuencias. La especificidad de las parejas de cebadores diseñadas se determinó mediante el análisis del ADN extraído a partir de 23 cepas de *Alternaria*, correspondientes a 11 especies de este género, así como de diversas especies fúngicas pertenecientes a otros géneros, levaduras, bacterias, animales y plantas. Todas las parejas de cebadores diseñadas demostraron ser específicas frente al grupo de especies correspondiente, no originando bandas de amplificación a partir del ADN de especies de *Alternaria* pertenecientes a otros grupos (Figura 3, pág. 78). La utilización de los cebadores específicos de los distintos grupos de especies de *Alternaria*, junto con el cebador Dir3Alta1 produjo la amplificación de un fragmento de 97 pb a partir del ADN de todas las especies de *Alternaria* analizadas y no interfirió en la amplificación del fragmento específico de grupo

(Figura 3, pág. 78). Además, las parejas de cebadores utilizadas no produjeron bandas de amplificación a partir del ADN de organismos diferentes al género *Alternaria* (no se muestran los resultados).

Aunque existen diversos trabajos sobre la detección de especies de *Alternaria* en alimentos mediante técnicas de PCR empleando cebadores específicos (Zur y col., 1999, 2002; Konstantinova y col., 2002), este es el primer trabajo de PCR múltiple desarrollado para la detección simultánea de *Alternaria* spp. y la identificación del grupo a que pertenece la especie detectada.

El límite de detección de la técnica de PCR múltiple desarrollada se determinó mediante la amplificación del ADN obtenido a partir de las diluciones decimales de cultivos de *A. alternata*, *A. radicina*, *A. porri* y *A. infectoria* viables e inactivados por calor y muestras de pulpa de tomate inoculadas con las diluciones de cada uno de los cultivos. El límite de detección conseguido en todos los cultivos analizados con cada una de las parejas de cebadores fue de  $10^2$  UFC/mL, tanto en los cultivos viables (Figura 5, pág. 80) como en los inactivados por calor a 60 °C/30 min (no se muestran los resultados) o 90 °C/5 min (Figura 5, pág. 80). Sin embargo, conviene señalar que en el caso de muestras de pulpa de tomate inoculadas con cultivos de *A. alternata* y *A. porri* inactivados a 90 °C durante 5 min el límite de detección fue de  $10^3$  UFC/mL.

Con el fin de comprobar la aplicabilidad de la técnica de PCR múltiple para la detección de *Alternaria* spp. y la identificación de los distintos grupos de especies, se

analizaron las 10 muestras de productos comerciales en las que se detectó la presencia de ADN de *Alternaria* spp. con las parejas de cebadores específicas de género descritas en el apartado anterior. El análisis de dichas muestras con los cebadores de cada grupo de especies, junto con el específico de género, puso de manifiesto la presencia de ADN del grupo de *A. infectoria* en las cuatro muestras positivas de papillas de cereales. En las tres muestras positivas de tomate alterado y en los tres productos comerciales de tomate solamente se obtuvo amplificación con los cebadores específicos del grupo de *A. alternata* (Tabla 3, pág. 82). Estos resultados coinciden con los obtenidos mediante el análisis filogenético de las secuencias de los productos de PCR del ITS y el gen *Alt a 1*.

La detección de ADN de especies del grupo de *A. alternata* en productos comerciales de tomate reviste especial interés desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, ya que las especies del grupo de *A. alternata* producen micotoxinas como el AOH, AME o TeA, que permanecen activas en los alimentos procesados (Andersen y col., 2001, 2002). Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los descritos por otros investigadores, que también han detectado la presencia de especies del grupo de *A. alternata* en muestras comerciales de tomate fresco y procesado (Barkai-Golan y Paster, 2008; Logrieco y col., 2009; Andrés y col., 2010; Somma y col., 2011).

El análisis de las muestras de papillas de cereales demostró la presencia de ADN de especies del grupo de *A. infectoria*.

Las especies de *Alternaria* pertenecientes a este grupo se han aislado frecuentemente de muestras de cereales (Andersen y col., 1996, 2002; Dugan y Peever, 2002; Perelló y Sisterna, 2006; Perelló y col., 2008). La toxicidad de las infectopironas y las novaezelandinas, principales metabolitos producidos por las especies de este grupo, aún no se ha establecido (Christensen y col., 2005; Andersen y col., 2009). Sin embargo, la presencia de ADN de especies del grupo de *A. infectoria* en muestras de papillas de cereales causa especial preocupación, ya que estos alimentos son la base fundamental de la alimentación en las primeras etapas de la vida.

Los resultados obtenidos demuestran que la técnica de PCR múltiple desarrollada es rápida y específica para la detección y diferenciación de los principales grupos de especies de *Alternaria*. En consecuencia, se trata de técnicas que permitirían la detección e identificación precoz de las principales especies fitopatógenas en cultivos sensibles y el establecimiento de medidas preventivas y correctoras con el fin de reducir las pérdidas económicas en el sector primario.

#### **IV.3. RELACIÓN ENTRE LA DETECCIÓN DE ADN DE *ALTERNARIA* SPP. MEDIANTE UNA TÉCNICA DE PCR Y LA PRESENCIA DE MICOTOXINAS PRODUCIDAS POR ESTE GÉNERO EN TOMATE Y DERIVADOS**

Las técnicas de PCR desarrolladas en este trabajo son rápidas y específicas para la detección de ADN de *Alternaria* spp. en muestras comerciales. Sin embargo, la obtención de resultados positivos mediante



técnicas de PCR no implica necesariamente la presencia de micotoxinas en las muestras analizadas.

Entre las técnicas rápidas que en los últimos años han demostrado ser de mayor utilidad para el análisis de micotoxinas en los alimentos destacan las inmunoenzimáticas y las cromatográficas. La principal ventaja de las técnicas cromatográficas, y en concreto, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es su sensibilidad y especificidad y que no requieren disponer de anticuerpos específicos. La técnica de HPLC se ha utilizado para analizar la presencia en alimentos de toxinas de *Alternaria* spp. (Andersen y col., 2006; Terminiello y col., 2006; Magnani y col., 2007; Patriarca y col., 2007; Siegel y col., 2009; Pose y col., 2010), *Aspergillus* spp. (Magnoli y col., 2007; Zinedine y col., 2007; Fredlund y col., 2009; Polisenska y col., 2010; Afsah-Hejri y col., 2011; Sheijooni-Fumani y col., 2011; Kumar y col., 2012), *Fusarium* spp. (Schollenberger y col., 2007; Trebstein y col., 2008; Ndube y col., 2009; Bao y col., 2011; Kassim y col., 2011; Atoui y col., 2012) y *Penicillium* spp. (Nunez y col., 2007; Watanabe, 2008; Celli y col., 2009; Polisenska y col., 2010; Kumar y col., 2012). Sin embargo, el mayor inconveniente de estas técnicas es que son laboriosas y caras y que requieren disponer de personal especializado. Además, debido a que en un mismo alimento pueden estar presentes múltiples micotoxinas, no resulta práctico ni realista detectar cada una de ellas, puesto que su elevado coste lo haría inviable.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, otro de los objetivos de este

trabajo ha consistido en la puesta a punto de una técnica de HPLC para la detección de ALT, AOH y AME, con el fin de comprobar si las técnicas de PCR desarrolladas se podrían utilizar como marcador indirecto de la presencia de micotoxinas producidas por *Alternaria* spp. y, por tanto, como indicador de bioseguridad, en productos hortofrutícolas frescos y transformados.

La técnica de HPLC con detector de array de diodos (DAD) permitió detectar las micotoxinas de *Alternaria* spp. analizadas en menos de 16 minutos, obteniéndose tiempos de retención de 10,8 min para el ALT, 12,8 min para el AOH y 15,6 min para el AME. La identificación de las tres micotoxinas analizadas se realizó teniendo en cuenta el tiempo de retención, el espectro de absorción entre 200 y 600 nm y el análisis de los perfiles de fragmentación obtenidos mediante espectrometría de masas de trampa de iones (Figura 1, pág. 99).

El límite de detección para cada una de las micotoxinas analizadas se determinó a partir de las rectas de calibrado elaboradas con concentraciones de 0,5, 1, 2, 5 y 10 µg/mL para cada una de las micotoxinas, obteniéndose coeficientes de correlación superiores a 0,999 para ALT y AOH, y de 0,98 para AME (no se muestran los resultados). Los límites de detección fueron de 1,7 µg/L para ALT, 19,7 µg/L para AOH y 0,37 µg/L para AME, correspondientes a 0,34, 3,94 y 0,074 µg/kg. Los límites de detección obtenidos son inferiores a los descritos por da Motta y Soares (2000a) y Solfrizzo y col. (2004), ambos basados en técnicas de

HPLC-DAD para la detección de micotoxinas de *Alternaria* spp. en alimentos.

Las micotoxinas de *Alternaria* spp. se han detectado en multitud de productos hortofrutícolas. En este trabajo se seleccionaron 90 muestras comerciales de tomates frescos y procesados. La extracción de las micotoxinas producidas por *Alternaria* spp. se realizó según el método descrito por Magnani y col. (2007), modificado para adaptarlo a muestras de tomate. Este método está basado en la extracción de ALT, AOH y AME con acetonitrilo, seguida de la purificación en columnas de extracción en fase sólida Oasis HLB (Waters, Milford, Estados Unidos).

La capacidad de recuperación de las micotoxinas por este método se evaluó mediante el análisis de muestras de tomate contaminadas con concentraciones de 0,5, 1 y 2 µg/g de cada una de las micotoxinas analizadas. Las muestras de tomate se analizaron previamente para comprobar la ausencia de ALT, AOH y AME. Los porcentajes de recuperación para las micotoxinas analizadas fueron elevados, obteniéndose recuperaciones medias de 98,4 % para ALT, 111 % para AOH y 97,1 % para AME (Tabla 1, pág. 97). Las recuperaciones obtenidas fueron similares a las descritas en otros estudios de análisis de micotoxinas de *Alternaria* spp. (Fente y col., 1998; Lau y col., 2003; Magnani y col., 2007; Azcarate y col., 2008).

Una vez puesta a punto la metodología, se analizaron por HPLC 90 muestras comerciales de tomates frescos y procesados, incluyendo 20 muestras de tomate fresco, catorce de las cuales eran tomates con podredumbre y seis tomates sanos. Asimismo,

se analizaron 70 productos comerciales de tomate, de los que 26 eran salsas de tomate, 18 muestras de tomate seco, 13 muestras de ketchup y 13 muestras de conservas de tomate (entero, triturado, etc.).

Todos los productos comerciales analizados por HPLC se analizaron también mediante la técnica de PCR con cebadores específicos de *Alternaria* spp. previamente desarrollada en esta tesis doctoral con el marcador genético ITS (Pavón y col., 2011). Sin embargo, teniendo en cuenta que en la elaboración de productos comerciales como salsas, zumos o conservas, las materias primas se someten a diferentes tratamientos que pueden degradar el ADN, se aumentaron a cincuenta los ciclos de amplificación de la técnica de PCR, con el fin de garantizar la detección del ADN de *Alternaria* spp. sin comprometer la sensibilidad. La especificidad de la técnica no se vio afectada por el aumento de ciclos de amplificación, ya que no se produjo amplificación a partir del ADN de otras especies fúngicas, levaduras, bacterias, animales y plantas (no se muestran los resultados).

El análisis por PCR convencional con los cebadores Dir1ITSAlt e Inv1ITSAlt puso de manifiesto la presencia de ADN de *Alternaria* spp. en 41 de las 90 muestras analizadas (45,6 %), mientras que la detección por HPLC de al menos una de las micotoxinas analizadas se observó en 31 de las 90 muestras (34,4 %) (Tabla 2, pág. 98). Ninguna de las seis muestras de tomates sanos contenía ADN de *Alternaria* spp. ni micotoxinas producidas por este género. Sin embargo, en las 14 muestras de tomates alterados

se amplificó ADN de *Alternaria* spp., y en 11 de ellas se detectó la presencia de al menos una de las micotoxinas analizadas (78,6 %), con concentraciones máximas de ALT, AOH y AME de 11 720, 73 490 y 140 µg/kg, respectivamente. Los recuentos fúngicos obtenidos mediante la siembra de diluciones de las muestras en placas de Sabouraud-CAF fueron de  $10^2$  -  $10^3$  UFC/g en las muestras de tomate alterado, mientras que no se observó crecimiento fúngico en las muestras de tomate sano. Las concentraciones máximas de ALT y AOH detectadas son más elevadas que las descritas por Stinson y col. (1981), los cuales detectaron concentraciones máximas de ALT y AOH de 1100 y 5300 µg/kg, respectivamente.

Por otra parte, en 27 de las 70 muestras de productos procesados (38,6 %) se produjo amplificación del ADN de *Alternaria* spp. (Tabla 2, pág. 98). En 12 de las 18 muestras de tomate desecado (66,7 %) se amplificó ADN de *Alternaria* spp. y se detectó al menos una de las micotoxinas analizadas, determinándose niveles máximos de ALT, AOH y AME de 1010, 980 y 118 µg/kg, respectivamente. Por el contrario, solo 2 de las 13 muestras de tomate enlatado (20,5 %) contenían ADN de *Alternaria* spp. y la única micotoxina detectada fue ALT con una concentración máxima de 870 µg/kg. Además, 6 de las 13 muestras de ketchup (46,2 %) contenían ADN de *Alternaria* spp., y en 4 de ellas se detectó la presencia de ALT y AOH, determinándose niveles máximos de 21 320 y 680 µg/kg, respectivamente. Por último, 7 de las 26 muestras de salsa de tomate (26,9 %) fueron positivas por PCR, y en 2 de ellas se detectó ALT con una concentración

máxima de 22 820 µg/kg. Además, conviene resaltar que en ninguna de las muestras con resultado negativo en la técnica de PCR para la presencia de ADN de *Alternaria* spp. se detectaron las micotoxinas analizadas. Las concentraciones de AOH detectadas en los productos procesados son menores que las descritas por Terminiello y col. (2006), los cuales detectaron en muestras de tomate triturado concentraciones de AOH entre 187 y 8756 µg/kg. Además, Stinson y col. (1981) y Terminiello y col. (2006) detectaron concentraciones superiores de AME con niveles máximos de 800 y 1734 µg/kg, respectivamente. Sin embargo, da Motta y Soares (2001) no detectaron la presencia de AOH y AME en las muestras de productos comerciales de tomate que analizaron.

La identidad de cada una de las micotoxinas detectadas en las muestras analizadas se confirmó mediante espectrometría de masas de trampa de iones. Los perfiles de fragmentación del ALT, AOH y AME obtenidos a partir de las muestras de tomate y derivados (Figura 1, pág. 99) coinciden con los obtenidos a partir de los estándares (Figura 2, pág. 100).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que un elevado número de muestras de tomate desecado están contaminadas con ADN de *Alternaria* spp. y sus micotoxinas. Este hecho probablemente está relacionado con que durante las primeras etapas de secado de los tomates las condiciones ambientales son favorables para el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas. Los recuentos fúngicos obtenidos a partir de las muestras de tomate desecado

que contenían ADN de *Alternaria* spp. fueron de  $10 - 10^2$  UFC/g. Sin embargo, en el resto de muestras de productos procesados no se detectaron mohos viables. En consecuencia, la detección de ADN *Alternaria* spp. y sus micotoxinas en productos transformados, como tomate enlatado, ketchup y salsas de tomate, puede deberse a la utilización de materias primas con alteraciones fúngicas.

Conviene señalar que en todas las muestras de productos comerciales de las que no se obtuvo amplificación con la pareja de cebadores específicos de *Alternaria* spp., sí se amplificó correctamente el ADN con los cebadores 18SFwEu/18SRvEu, empleados como control positivo de amplificación, lo que demuestra que los resultados negativos con los cebadores específicos no se deben a la presencia de inhibidores o a la degradación del ADN, sino a la ausencia de ADN de *Alternaria* spp.

La correlación existente entre la detección de ADN de *Alternaria* spp. y la presencia de ALT, AOH o AME en las muestras de tomate fresco y procesado es significativa, puesto que 31 de las 41 muestras positivas por PCR (75,6 %) contenían al menos una de las micotoxinas producidas por *Alternaria* spp. Este es el primer estudio que demuestra la correlación entre la detección de ADN de *Alternaria* spp. y la presencia de micotoxinas de este género. Sin embargo, otros investigadores han detectado una correlación positiva entre la detección de ADN de *Fusarium culmorum* y la presencia de nivalenol en muestras de cereales (Pasquali y col., 2010), entre la concentración de ADN de *F. graminearum* y el contenido de deoxi-

nivalenol en muestras de cebada y malta (Sarlin y col., 2006) y entre la concentración de ADN de *F. graminearum* y el contenido de zearalenona presente en muestras de maíz (Atoui y col., 2012).

La ausencia de ALT, AOH o AME en algunas muestras positivas por PCR, podría indicar la presencia en las mismas de especies de *Alternaria* no productoras de esas micotoxinas, como son las pertenecientes al grupo de *A. infectoria* (Andersen y col., 2009). Además, algunas especies pertenecientes al grupo de *A. alternata*, como *A. longipes*, no siempre producen estas micotoxinas, ya que la síntesis está determinada por las condiciones ambientales en que se desarrolla el moho (Andersen y col., 2001). Para confirmar esta hipótesis, las 10 muestras positivas por PCR y negativas en el análisis de micotoxinas, se amplificaron y secuenciaron con los cebadores Dir1ITSAlt e Inv1ITSAlt. Las secuencias obtenidas se registraron en la base de datos *Genbank/EMBL* con los siguientes números de acceso: salsa de tomate TA046 (FR863589), salsa de tomate TA047 (FR863590), salsa de tomate TA050 (FR863591), salsa de tomate TA109 (FR863597), salsa de tomate TA110 (FR863598), tomate alterado TA090 (FR863592), tomate alterado TA092 (FR863593), tomate alterado TA093 (FR863594), ketchup TA078 (FR863595) y ketchup TA079 (FR863596). Las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en la base de datos y se determinó la presencia de ADN de *A. infectoria* en tres muestras de salsa de tomate (TA050, TA109 y TA110) y en las tres muestras de tomate alterado (TA090, TA092 y TA093), lo que

explica la ausencia de las micotoxinas analizadas en estas muestras. Además, se determinó la presencia de ADN de especies pertenecientes al grupo de *A. alternata* en dos muestras de salsa de tomate (TA046 y TA047) y en las dos muestras de ketchup (TA078 y TA079), aunque no se pudo determinar la especie concreta mediante el análisis de las secuencias obtenidas.

Actualmente, la UE no tiene establecidos límites máximos para ninguna de las micotoxinas de *Alternaria* spp. aisladas en alimentos. Sin embargo, teniendo en cuenta los datos sobre toxicidad y la creciente presencia de estas toxinas en alimentos, el Instituto Federal de Evaluación de Riesgos de Alemania (BfR, 2003), el Comité de Científicos Alimentarios de la República Checa (CSCF, 2008) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2011), consideran necesario realizar nuevos estudios sobre la toxicidad de las micotoxinas producidas por *Alternaria* spp. y su presencia en alimentos, con el fin de disponer de datos objetivos que permitan evaluar la situación actual con vistas a establecer límites máximos permitidos.

Los resultados obtenidos del análisis por HPLC y PCR de muestras de alimentos naturalmente contaminadas con micotoxinas producidas por *Alternaria* spp. permiten concluir que la técnica de PCR utilizada podría emplearse como marcador de calidad y bioseguridad de materias primas y productos transformados, indicando la posible presencia de micotoxinas de *Alternaria* spp.

#### IV.4. DESARROLLO DE TÉCNICAS DE PCR Y RT-PCR EN TIEMPO REAL PARA

#### LA DETECCIÓN DE *ALTERNARIA* SPP. EN PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS FRESCOS Y PROCESADOS

En la actualidad, las técnicas de PCR convencionales que se desarrollan en varios pasos, desde la amplificación del material genético hasta el análisis de los productos finales, están evolucionando hacia procedimientos más rápidos y automatizados en un solo tubo. Estas técnicas se basan en el uso de equipos de PCR con detección espectrofluorimétrica con los que es posible realizar un seguimiento en tiempo real del proceso de amplificación del ADN. En los sistemas de PCR en tiempo real, un programa informático va registrando el incremento de fluorescencia, que es proporcional al aumento de ADN en cada ciclo, y esta información se refleja gráficamente en rectas de cinética de la reacción o rectas de amplificación. Para cada muestra, el programa informático calcula el número de ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo con respecto a la señal base. El ciclo en el que empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina ciclo umbral ( $C_t$ , *Threshold Cycle*) o punto de corte ( $C_p$ , *Crossing Point*) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra. Así, cuanto mayor sea el número inicial de copias del ácido nucleico diana, antes se detectará un incremento en la fluorescencia como consecuencia del acúmulo de productos de PCR. Una de las principales ventajas de esta metodología es que proporciona un resultado numérico en tiempo real que permite la cuantificación de las especies de interés y el tratamiento estadístico de los datos obteni-

dos (Wilhelm y Pingoud, 2003; Russell y Paterson, 2006).

Como último objetivo de esta tesis doctoral se planteó el desarrollo de técnicas de PCR y RT-PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de *Alternaria* spp. en productos hortofrutícolas frescos y procesados. Los procedimientos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en la plataforma de detección *LightCycler* 2.0 de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). Este equipo permite utilizar tubos capilares de 20 y 100 µL, lo que posibilita el trabajo con distintos volúmenes de reacción. Además, dispone de seis canales de detección a longitudes de onda de 530, 560, 610, 640, 670 y 710 nm, que le permiten trabajar con distintos tipos de moléculas fluorescentes.

La detección de los productos amplificados mediante PCR en tiempo real se realizó mediante el empleo de sondas específicas TaqMan®. Las sondas TaqMan® son oligonucleótidos marcados con fluorocromos en los dos extremos, que son capaces de hibridar en regiones internas y específicas de la secuencia del ADN diana, evitando falsos positivos si se generan productos de PCR inespecíficos o dímeros de cebadores. El fluorocromo situado en el extremo 5' se llama donador (*reporter*) y el del extremo 3' recibe el nombre de aceptor (*quencher*). Cuando la sonda (que se incluye en la reacción de PCR conjuntamente con los cebadores) está íntegra, la proximidad del donador y del aceptor provoca un fenómeno denominado FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster o transferencia de energía de resonancia fluorescente), que se

traduce en la anulación de la fluorescencia de la sonda. En el curso de la reacción de PCR, la sonda se une a su secuencia diana cuando se encuentra presente en la reacción. Durante la extensión de la cadena de ADN, la actividad 5' exonucleasa de la enzima Taq polimerasa provoca la liberación del donador del extremo 5' de la sonda, que al separarse del aceptor comienza a emitir fluorescencia. La acumulación de los productos de PCR se detecta monitorizando el aumento de fluorescencia por la liberación del donador (Livak y col., 1995).

### Técnica de PCR en tiempo real

Para desarrollar este objetivo del trabajo se emplearon los cebadores específicos de *Alternaria* spp., Dir1ITSAlt/Inv1ITSAlt, diseñados previamente (Pavón y col., 2011). El diseño de la sonda TaqMan® se llevó a cabo mediante el análisis y comparación de las secuencias del ITS de las especies de *Alternaria* disponibles. El estudio del alineamiento permitió diseñar la sonda TaqMan® AltTM en la región delimitada por los cebadores específicos. Por otra parte, como control positivo de amplificación se utilizaron los cebadores conservados 18SFwEu/18SRvEu y la sonda TaqMan® 18STM diseñados por Martín y col. (2009) a partir de secuencias de organismos eucariotas del gen 18S ARNr.

La especificidad del sistema de PCR en tiempo real desarrollado se evaluó mediante el análisis de ADN procedente de 23 cepas de *Alternaria*, así como de diversas especies fúngicas pertenecientes a otros géneros, levaduras, bacterias, animales y plantas. El sistema específico de cebadores y sonda produjo una señal de amplificación a



partir del ADN de todas las especies de *Alternaria* analizadas. En el resto de organismos diferentes al género *Alternaria* no se observó señal de amplificación después de 45 ciclos (Tabla 1, pág. 107). Como ya se ha señalado, los métodos que emplean sondas TaqMan® requieren la unión específica de la sonda fluorescente a la secuencia diana delimitada por los cebadores específicos, no siendo necesario llevar a cabo análisis posteriores (curvas de desnaturalización térmica) como ocurre al utilizar intercaladores inespecíficos como la molécula SYBR® Green (Wilhelm y Pingoud, 2003; Russell y Patterson, 2006). Por otra parte, con el empleo del sistema de control positivo de amplificación (cebadores y sonda de eucariotas del gen 18S ARNr), se obtuvo amplificación a partir del ADN de todas las especies eucariotas analizadas (Tabla 1, pág. 107). El método de PCR en tiempo real desarrollado detecta todas las especies del género *Alternaria*, a diferencia del trabajo desarrollado por Guillemette y col. (2004), en el que solo se detectaba *A. brassicae*, o el de Andersen y col. (2006), que tenía por objetivo la detección de las especies de *Alternaria* patógenas de las manzanas, que son productoras de AM toxinas.

Tras determinar la especificidad de la técnica, se procedió a evaluar la eficiencia y el límite de detección de la misma. Para ello se construyeron rectas de calibración a partir de diluciones decimales de un cultivo de *A. alternata* viable y sometido a un tratamiento térmico de 90 °C durante 5 min. Los recuentos de *A. alternata* obtenidos antes del tratamiento fueron de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^{-1}$  UFC/mL, con concentraciones teóri-

cas de ADN de *A. alternata* de  $3 \times 10^3$  a  $3 \times 10^{-4}$  ng por reacción. Las concentraciones de ADN se estimaron a partir de la medida del ADN presente en las dos primeras diluciones de cultivo ( $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^5$  UFC/mL).

Las rectas de calibración obtenidas empleando las diluciones de cultivo de *A. alternata* mostraron una relación lineal entre el logaritmo de los recuentos de *A. alternata* y los valores de  $C_p$  ( $R^2 = 0,9921$  (Figura 1A, pág. 107) y  $0,9901$  (Figura 1B, pág. 107) para las rectas construidas a partir de las diluciones del cultivo viable e inactivado por calor, respectivamente). Dicha linealidad se observó para el intervalo comprendido entre 1 y  $1 \times 10^6$  UFC/mL, equivalente a concentraciones de ADN de  $3 \times 10^{-3}$  a  $3 \times 10^3$  ng por reacción. Por tanto, la sensibilidad de la técnica fue de 1 UFC/mL (3 pg de ADN por reacción), que se corresponde con la mínima cantidad de ADN detectada.

Las técnicas de PCR en tiempo real descritas en la bibliografía para detectar y cuantificar especies de *Alternaria* en muestras de manzana (Andersen y col., 2006) y *A. brassicae* en crucíferas (Guillemette y col., 2004), tienen límites de detección similares a los conseguidos en este trabajo. Por otra parte, el método de PCR en tiempo real desarrollado representa una gran ventaja en términos de rapidez de análisis y sensibilidad respecto a los métodos de PCR convencional previamente desarrollados en esta tesis doctoral (Pavón y col., 2010, 2011), en los que el límite de detección fue de  $10^2$  UFC/mL, dos órdenes de magnitud supe-

rior al obtenido con la técnica de PCR en tiempo real.

La eficiencia de la técnica de PCR en tiempo real, que indica la capacidad de la reacción para duplicar el número de copias de las cadenas de ADN en cada ciclo, se calculó a partir de las pendientes de las rectas de calibración obtenidas al representar los valores de  $C_p$  frente al logaritmo de los recuentos de *A. alternata* en Sabouraud-CAF de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$E = [10^{(-1/\text{pendiente})} - 1] * 100$$

La pendiente de las rectas fue de -3,47 para el cultivo viable (Figura 1A, pág. 107) y -3,49 para el cultivo inactivado por calor (Figura 1B, pág. 107), que corresponden a eficiencias de 94 y 93,6 %, respectivamente. Las eficiencias de reacción óptimas para un ensayo de PCR en tiempo real deben estar comprendidas entre el 90 % y 105 %. Eficiencias por debajo del 90 % pueden deberse a un mal diseño de cebadores o a condiciones de reacción subóptimas. Por el contrario, eficiencias mayores del 100 % pueden indicar errores de pipeteo o presencia de contaminaciones (Dorak, 2006).

La precisión o el grado de dispersión de los resultados del análisis en torno a un porcentaje de concentración, indica el error aleatorio del método. Cuando el método se lleva a cabo manteniendo siempre las mismas condiciones, la precisión atribuida al mismo se conoce como repetibilidad. La precisión del ensayo se evaluó comparando los coeficientes de variación (CV) de los valores obtenidos para un mismo recuento de *A. alternata* en tres días diferentes con los valores obtenidos en el mismo día. De esta

forma se evalúa la influencia del día del análisis en los resultados. Las diferencias entre los coeficientes de variación de los valores obtenidos al realizar el ensayo en tres días diferentes y los valores obtenidos en el mismo día fueron menores de 1 %, tanto en el cultivo viable como en el inactivado por calor.

Con el fin de evaluar si la técnica de PCR en tiempo real desarrollada podría utilizarse para la detección y cuantificación de ADN de *Alternaria* spp. en muestras de alimentos, era necesario validar el método en matrices alimentarias. Esta validación podría facilitar la incorporación de la técnica a los programas de autocontrol (sistemas APPCC) en la industria alimentaria. Los alimentos pueden contener componentes que inhiban la reacción de PCR en tiempo real, por lo que es importante determinar si la eficiencia del método de PCR en tiempo real desarrollado permanece en los valores recomendados y la capacidad de cuantificación es precisa cuando se analizan.

La influencia de una matriz alimentaria en la capacidad del método para detectar *Alternaria* spp. se evaluó mediante el análisis de muestras de pulpa de tomate inoculadas con diluciones decimales de un cultivo de *A. alternata* viable y el mismo cultivo sometido a un tratamiento térmico de 90 °C durante 5 min. Las rectas de calibración obtenidas mostraron una buena linealidad entre el logaritmo de los recuentos de *A. alternata* y los valores de  $C_p$  en el intervalo de 1 - 10<sup>5</sup> UFC/mL, con valores de  $R^2$  de 0,993 (Figura 2A, pág. 108) y 0,9927 (Figura 2B, pág. 108), para las muestras de pulpa de

tomate inoculadas con diluciones del cultivo viable e inactivado por calor, respectivamente. Además, los coeficientes de variación de los valores de  $C_p$  obtenidos al realizar el ensayo en tres días diferentes y los valores obtenidos en el mismo día fueron menores de 0,85 %, tanto en pulpa de tomate inoculada con el cultivo viable como con el inactivado por calor.

La reproducibilidad del método se determinó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de los valores de  $C_p$  obtenidos en ambas rectas de calibración para cada una de las concentraciones de *Alternaria*. Los parámetros estadísticos se evaluaron con el programa informático STATGRAPHICS Centurion 15.2.14 (XV). No se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,0001$ ) entre los valores de cuantificación obtenidos con ambas rectas y los coeficientes de variación observados fueron muy bajos. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se elaboró una nueva recta de calibrado a partir de los valores de  $C_p$  obtenidos al analizar las muestras de pulpa de tomate inoculadas con el cultivo viable e inactivado (Figura 2C, pág. 108). La linealidad ( $R^2 = 0,987$ ) y la eficiencia (90 %) de la nueva recta se encuentran también dentro de los valores óptimos de cuantificación.

Una vez demostrada la capacidad del sistema de PCR en tiempo real para el análisis cuantitativo de muestras de pulpa de tomate contaminadas experimentalmente, se comprobó su aplicabilidad para la detección y cuantificación de *Alternaria* spp. en diversos productos comerciales, entre los que se incluían 80 muestras de productos hortofrutí-

colas frescos y 110 muestras de productos transformados (Tabla 2, pág. 109). Conviene señalar que 44 de las muestras de frutas y hortalizas frescas presentaban un crecimiento fúngico evidente. El análisis con el sistema de cebadores y sonda diseñado demostró la presencia de ADN de *Alternaria* spp. en 46 de las 80 muestras analizadas (57,5 %). La presencia de colonias de *Alternaria* spp. en las muestras analizadas se determinó mediante la siembra en PCA, ya que la esporulación en este medio de cultivo es adecuada y facilita la identificación. Al analizar las características morfológicas y fisiológicas de los hongos que se desarrollaron en PCA, se observó el crecimiento predominante de especies de *Alternaria*, aunque también se desarrollaron especies pertenecientes a los géneros *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Cladosporium*. Estos géneros fúngicos se han aislado con frecuencia de muestras de tomate, fresa, zanahoria y manzana (Ellis y Ellis, 1997; Andersen y Frisvad, 2004). Por otra parte, los recuentos de *Alternaria* spp. presentes en una muestra problema se calcularon interpolando los valores de  $C_p$  obtenidos de la muestra, en la recta de calibración generada a partir de las muestras de pulpa de tomate inoculadas tanto con el cultivo viable como con el inactivado por calor. Ninguno de los productos hortofrutícolas sanos mostró crecimiento de *Alternaria* spp., con la excepción de una muestra de fresa, cuyo recuento de *Alternaria* spp. fue de 10 UFC/g. Sin embargo, se determinó la presencia de ADN de *Alternaria* spp. en 3 muestras de zanahoria sana y en la muestra de fresa con crecimiento fúngico, aunque los recuentos eran bajos (2 - 15 UFC/g). Por el

contrario, se observó una elevada incidencia de *Alternaria* spp. en las muestras alteradas, detectándose ADN de *Alternaria* spp. en el 95,5 % de las muestras analizadas, con valores de  $C_p$  comprendidos entre 15,72 y 32,05. Además, las muestras positivas por PCR en tiempo real presentaron recuentos de *Alternaria* spp. entre 10 y  $6 \times 10^4$  UFC/g, con la excepción de 3 muestras de zanahoria alterada, en las que los recuentos en PCA fueron negativos. Los recuentos de *Alternaria* spp. estimados por PCR en tiempo real se compararon con los recuentos obtenidos en PCA (Figura 3A, pág. 109), mostrando una correlación significativa ( $R^2 = 0,9006$ ,  $P < 0,01$ ). Las diferencias existentes entre los recuentos obtenidos por ambos métodos pueden deberse a errores experimentales cometidos durante el procesamiento de las muestras o una identificación incorrecta de los géneros fúngicos desarrollados en PCA.

Por otra parte, en 47 de las 90 muestras de tomate procesado (52,2 %) y en 19 de las 20 muestras de pimiento desecado (95 %) se produjo amplificación del ADN de *Alternaria* spp. (Tabla 3, pág. 110). De manera similar a lo descrito para las muestras frescas, se obtuvo una correlación significativa ( $R^2 = 0,9778$ ,  $P < 0,01$ ) entre los recuentos de *Alternaria* spp. estimados y los recuentos obtenidos en PCA (Figura 3B, pág. 109). Los recuentos fueron altos tanto en las muestras de tomate desecado como en las de pimiento desecado, probablemente debido a que durante las primeras etapas de secado de los tomates y pimientos las condiciones ambientales son favorables para el crecimiento fúngico. Por otra parte, los recuentos en PCA de los demás productos de

tomate transformado fueron negativos, como consecuencia de la inactivación fúngica causada por el tratamiento térmico. Sin embargo, 19 de las 52 (36,5 %) muestras contenían ADN de *Alternaria* spp., y en seis de ellas los recuentos de *Alternaria* spp. estimados fueron superiores a  $1 \times 10^4$  UFC/g. Estos resultados indican la utilización de tomates deteriorados en la elaboración de dichos productos transformados, con el consiguiente riesgo de presencia en ellos de micotoxinas de *Alternaria* spp.

Por último, conviene señalar que en todas las muestras de productos comerciales de las que no se obtuvo amplificación con el sistema específico de *Alternaria* spp., sí se amplificó correctamente el ADN con el sistema de cebadores y sonda empleado como control positivo de amplificación (Tablas 2 y 3, págs. 109 y 110), lo que demuestra que los resultados negativos con el sistema específico no se deben a la presencia de inhibidores o a la degradación del ADN, sino a la ausencia de ADN de *Alternaria* spp.

La detección de *Alternaria* spp. en productos hortofrutícolas frescos y procesados es importante desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, debido a la presencia de micotoxinas en estas matrices alimentarias. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los obtenidos por otros investigadores, que también han detectado la presencia de especies de *Alternaria* en tomates alterados, así como en productos comerciales, causando pérdidas económicas importantes en las industrias de transformación de tomate (Terminiello y col., 2006; Ostry, 2008; Logrieco y col., 2009; Pose y col.,

2010). Jackson y Al-Taher (2008) determinaron la presencia de micotoxinas de *Alternaria* spp. en muestras de manzanas alteradas. La presencia de especies de *Alternaria*, y en concreto de *A. radicina* y *A. dauci*, también se ha detectado en muestras de zanahoria (Tylkowska, 1992; Konstantinova y col., 2002; Solfrizzo y col., 2004). Asimismo, se ha demostrado la presencia de *Alternaria* spp. en muestras de pimientos y fresas alteradas (Bottalico y Logrieco, 1998). Conviene señalar que en muchos de los casos en los que se ha determinado la presencia de ADN de *Alternaria* spp. las muestras analizadas presentaban crecimiento fúngico visible. El consumo directo de frutas y hortalizas con podredumbre fúngica visible es improbable. Sin embargo, no es infrecuente aislar toxinas de *Alternaria* spp. a partir de alimentos procesados como salsas de tomate, ketchup, tomates desecados, conservas, mermeladas, vino o zumos de frutas (manzana, tomate, uva y naranja) (Barkai-Golan y Paster, 2008). La detección de cada una de las micotoxinas producidas por *Alternaria* spp. en estos productos presenta el inconveniente de ser cara y laboriosa. Sin embargo, como se ha demostrado previamente en esta tesis doctoral (Pavón y col., 2012a), existe una correlación positiva entre la detección de ADN de *Alternaria* spp. y la presencia de micotoxinas producidas por este género en productos comerciales. Por este motivo, la técnica de PCR en tiempo real desarrollada podría utilizarse como marcador indirecto de la presencia de micotoxinas en alimentos.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la técnica de PCR en tiempo real desarrollada es rápida, específica y sen-

sible para la detección y cuantificación de *Alternaria* spp. en frutas y hortalizas frescas y procesadas. Si bien sería conveniente validar la técnica en un mayor número de alimentos, estos resultados parecen indicar que sería de gran utilidad para la monitorización de *Alternaria* spp. y sus micotoxinas en los sistemas APPCC de la industria alimentaria.

### **Técnica de RT-PCR en tiempo real**

Las técnicas genéticas desarrolladas en los objetivos anteriores de esta tesis doctoral están basadas en la detección del ADN de *Alternaria* spp. Teniendo en cuenta que el ADN es una molécula relativamente estable, su detección no permite la discriminación entre células viables y no viables. Esta característica supone una ventaja frente a las técnicas fenotípicas de detección e identificación fúngica en productos hortofrutícolas transformados, ya que permite detectar la utilización de materias primas alteradas aunque los mohos ya no se encuentren viables. Sin embargo, el análisis del producto final no permite establecer acciones preventivas. La detección precoz de *Alternaria* spp. en las materias primas vegetales durante las primeras fases de colonización y desarrollo permitiría a las industrias de transformación rechazar lotes de materias primas inadecuadas y aplicar medidas preventivas para evitar la formación de micotoxinas. Por este motivo, se desarrolló una técnica de RT-PCR en tiempo real, basada en la amplificación del ARN ribosómico, para la detección y cuantificación de *Alternaria* spp. viables en alimentos.

La técnica de RT-PCR en tiempo real se realizó en dos etapas, utilizando en la primera cebadores de hexámeros aleatorios y la transcriptasa inversa para la obtención de ADNc a partir del ARN molde. En la segunda etapa, se empleó el sistema de cebadores y sonda descritos en el apartado anterior para la cuantificación del ADNc de *Alternaria* spp. mediante PCR en tiempo real. La especificidad del sistema de RT-PCR en tiempo real desarrollado se evaluó mediante el análisis de ARN procedente de 23 cepas de *Alternaria*, así como de diversas especies fúngicas pertenecientes a otros géneros, levaduras, bacterias, animales y plantas. El sistema específico de cebadores y sonda produjo una señal de amplificación a partir del ARN de todas las especies de *Alternaria* analizadas. En el resto de organismos diferentes al género *Alternaria* no se observó señal de amplificación después de 45 ciclos (Tabla 2, pág. 116).

Aunque existen diversos trabajos sobre la detección de otros mohos toxigénicos mediante técnicas de RT-PCR (Scherer y col., 2005; López-Erassquín y col., 2007; Degola y col., 2009; de Oliveira y col., 2011; Vegi y col., 2011), este es el primer trabajo de RT-PCR en tiempo real desarrollado para la detección de *Alternaria* spp.

La eficiencia y el límite de detección de la técnica se determinaron mediante el análisis de diluciones decimales de cultivos viables de *A. alternata*, *A. radicina*, *A. porri* y *A. infectoria*. Las rectas de calibración (Figura 1, pág. 117) mostraron una relación lineal entre el logaritmo de los recuentos de cada cultivo y los valores de  $C_p$ , obteniéndose

valores de  $R^2$  superiores a 0,99 en todas las rectas para el intervalo de 1 a  $10^5$  UFC/mL. El límite de detección de la técnica fue de 1 UFC/mL, que se corresponde con la mínima cantidad de ARNr detectada. La sensibilidad obtenida fue mejor que la de los métodos de PCR convencional previamente desarrollados en esta tesis doctoral utilizando los marcadores genéticos *Alt a 1* (Pavón y col., 2010) e ITS (Pavón y col., 2011). El aumento de la sensibilidad en dos órdenes de magnitud respecto a las técnicas de PCR convencionales puede explicarse por la presencia de un número elevado de copias de ARN y por la realización de la técnica en formato de tiempo real. Conviene señalar que con la técnica de RT-PCR en tiempo real se obtuvo el mismo límite de detección que con la técnica de PCR en tiempo real (Pavón y col., 2012b).

La pendiente de las rectas de calibración fue de -3,51 para el cultivo de *A. alternata* (Figura 1A, pág. 117), -3,5 para *A. infectoria* (Figura 1B, pág. 117), -3,58 para *A. radicina* (Figura 1C, pág. 117) y -3,53 para *A. porri* (Figura 1D, pág. 117) que corresponden a eficiencias de 92,7 %, 93,03 %, 90,4 % y 92,04 %, respectivamente. Por lo tanto, las eficiencias obtenidas se encuentran dentro del intervalo óptimo de cuantificación (90 - 105 %) (Dorak, 2006). Las diferencias entre los coeficientes de variación de los valores obtenidos al realizar el ensayo en tres días diferentes y los valores obtenidos en el mismo día fueron menores de 1 % para todas las diluciones de los cultivos de *Alternaria*.



La utilidad del ARNr como indicador de viabilidad de *Alternaria* spp. se estudió mediante el análisis de diluciones decimales de los cultivos sometidos a un tratamiento térmico de 90 °C durante 5 min. Además, para evaluar la estabilidad del ARNr al tratamiento térmico, la extracción del ARN se realizó inmediatamente después del tratamiento térmico, y se repitió después de transcurridas 6, 24 y 48 h. El límite de detección varió en función del tiempo de espera anterior a la extracción del ARN, siendo de  $10^3$  UFC/mL cuando la extracción se realizó inmediatamente después del tratamiento térmico, y de  $10^4$  y  $10^5$  UFC/mL cuando la extracción se realizó transcurridas 6 y 24 h, respectivamente. Cuando la extracción del ARN se realizó a las 48 h del tratamiento no fue posible su amplificación en ninguno de los cultivos de *Alternaria* spp. analizados. Es importante tener en cuenta que el recuento de *Alternaria* spp. en Sabouraud-CAF fue negativo después del tratamiento térmico en todas las diluciones de cultivo analizadas. Estos resultados indican que las células de *Alternaria* spp. no se encuentran viables después del tratamiento térmico, sin embargo, algunas mantienen cierta actividad metabólica hasta 24 h después del mismo.

Tras comprobar la idoneidad del marcador genético ITS ARNr como indicador de viabilidad de *Alternaria* spp., se evaluó la eficacia del tratamiento térmico empleado en la inactivación de *Alternaria* spp. mediante el análisis por citometría de flujo de un cultivo de *A. alternata* viable, del mismo cultivo inactivado a 90 °C/5 min, así como de una mezcla de ambos, tras su tinción con yoduro de propidio (Figura 4, pág. 118). Los resultados

demonstraron que un 98,73 % de las células de *A. alternata* estaban viables antes del tratamiento. Tras el tratamiento térmico, un 98,05 % de las células de *A. alternata* estaban inactivadas, pero un 1,95 % presentaban actividad metabólica, por lo que contenían moléculas de ARN estables que podrían ser amplificadas por la técnica de RT-PCR en tiempo real desarrollada. Por otra parte, la mezcla de cultivo viable e inactivado contenía un 50,46 % de las células viables. Estos resultados indican que en un cultivo de *A. alternata* con un recuento inicial de  $10^5$  UFC/mL, habría al menos  $10^3$  células fúngicas cuyo ARN podría ser amplificado después del tratamiento térmico, a pesar de no obtenerse crecimiento fúngico en Sabouraud-CAF.

La influencia de una matriz alimentaria en la capacidad del método para detectar *Alternaria* spp. se evaluó mediante el análisis de muestras de pulpa de tomate inoculadas con diluciones decimales de cultivos viables de *A. alternata*, *A. radicina*, *A. porri* y *A. infectoria* y los mismos cultivos sometidos a un tratamiento térmico de 90 °C durante 5 min. La recta de calibración obtenida a partir de las muestras de pulpa de tomate inoculadas con diluciones del cultivo de *A. alternata* viable mostró una buena linealidad ( $R^2 = 0,997$ ; Figura 2, pág. 117) y una eficiencia de 92,7 %, que corresponde con una pendiente de -3,51. Además, los coeficientes de variación de los valores de  $C_p$  obtenidos fueron menores de 0,34 %. De forma similar a lo expuesto para *A. alternata*, el límite de detección de la técnica fue de 1 UFC/mL en muestras de pulpa de tomate inoculadas con cultivos viables de *A. radicina*, *A. porri* y *A.*

*infectoria* (no se muestran los resultados). El análisis de la varianza (ANOVA) de los valores de  $C_p$  obtenidos en las rectas de calibración de los cultivos de *Alternaria* spp. viables y las muestras de pulpa de tomate inoculadas con estos cultivos, puso de manifiesto que no existían diferencias significativas ( $P < 0,0001$ ) entre los valores de cuantificación obtenidos con las distintas rectas y que los coeficientes de variación eran muy bajos. Teniendo en cuenta estos resultados, se elaboró una nueva recta de calibrado a partir de los valores de  $C_p$  obtenidos al analizar los cuatro cultivos de *Alternaria* spp. y las muestras de pulpa de tomate inoculadas con dichos cultivos (Figura 3, pág. 117). La linealidad ( $R^2 = 0,992$ ) y la eficiencia (92 %) de la nueva recta se encuentran también dentro de los valores óptimos de cuantificación. Por último, cuando se analizaron las muestras de pulpa de tomate inoculadas con las diluciones de los cultivos tratados térmicamente se obtuvieron resultados similares a los obtenidos al analizar los cultivos inactivados, no observándose crecimiento fúngico en Sabouraud-CAF. En consecuencia, la técnica de RT-PCR en tiempo real podría utilizarse para la cuantificación de *Alternaria* spp. viables en alimentos.

Un problema que puede afectar a los protocolos de RT-PCR deriva de la posible obtención de falsos positivos debidos a la presencia de ADN residual. Para comprobar la ausencia de ADN, se incluyó un control negativo sin transcriptasa inversa con cada una de las muestras analizadas, no obteniéndose señal de amplificación ni en las diluciones de los cultivos de *Alternaria* spp.

ni en las muestras de pulpa de tomate inoculadas con estos cultivos.

La aplicabilidad del sistema de RT-PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de *Alternaria* spp. viables se determinó mediante el análisis de 110 muestras de productos hortofrutícolas frescos y procesados, entre las que se incluían 60 muestras de productos hortofrutícolas frescos y 50 muestras de productos transformados (Tabla 3, pág. 119). Treinta de las muestras de frutas y hortalizas frescas presentaban un crecimiento fúngico evidente. El análisis con la técnica de RT-PCR en tiempo real demostró la presencia de ARNr de *Alternaria* spp. en 53 de las 110 muestras analizadas (48,2 %). La presencia de colonias de *Alternaria* spp. en las muestras analizadas se determinó mediante la siembra en PCA. Al analizar las características morfológicas y fisiológicas de los hongos que se desarrollaron en PCA, se observó el crecimiento predominante de especies de *Alternaria*, aunque también se desarrollaron especies pertenecientes a los géneros *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Cladosporium*. La presencia de colonias de *Rhizopus* y *Penicillium* se determinó con mayor frecuencia en las muestras de tomate y pimiento desecado que en las muestras de zanahoria, tomate y fresa y no se detectaron en las muestras de manzana. Las colonias de *Fusarium* se aislaron únicamente a partir de las muestras de tomate y manzana. Finalmente, las colonias de *Cladosporium* se aislaron de muestras de fresa, manzana y tomate. Por otra parte, los recuentos de *Alternaria* spp. presentes en una muestra problema se calcularon interpolando en la recta de calibra-

ción los valores de  $C_p$  obtenidos de la muestra (Figura 3, pág. 117). Ninguno de los productos hortofrutícolas sanos presentó crecimiento de *Alternaria* spp., con la excepción de una muestra de fresa, cuyo recuento de *Alternaria* spp. fue de 10 UFC/g. Además, fue la única muestra en la que se detectó la presencia de ARNr de *Alternaria* spp., con un valor de  $C_p$  de 30,18, correspondiente con 6 UFC/g. Por el contrario, se observó una elevada incidencia de *Alternaria* spp. en las muestras alteradas, detectándose ARNr de este género en 25 de las 30 muestras analizadas (83,3 %), con valores de  $C_p$  comprendidos entre 17,88 y 30,64. Además, las muestras positivas por RT-PCR en tiempo real presentaron recuentos de *Alternaria* spp. entre 10 y  $2 \times 10^4$  UFC/g. Por último, en las muestras donde no se observó crecimiento de *Alternaria* spp. no se obtuvo señal de amplificación.

Por otra parte, en 9 de las 20 muestras de tomate desecado (45 %) y en 18 de las 20 muestras de pimiento desecado (90 %) se produjo amplificación del ARNr de *Alternaria* spp. (Tabla 3, pág. 119). Los recuentos obtenidos fueron elevados tanto en las muestras de tomate desecado como en las de pimiento desecado. Sin embargo, no se detectó crecimiento de *Alternaria* spp. en PCA ni amplificación de ARN en los demás productos transformados de tomate, ya que los tratamientos térmicos a los que se someten dichos productos impiden la viabilidad de *Alternaria* spp. Conviene señalar que en ninguna de las muestras se obtuvo amplificación de ADN a partir del control negativo sin transcriptasa inversa, lo que demuestra que los resultados positivos no se deben a la

presencia de ADN residual de *Alternaria* spp. en las muestras.

Los recuentos de *Alternaria* spp. estimados por RT-PCR en tiempo real se compararon con los recuentos obtenidos en PCA (Figura 5, pág. 120), mostrando una correlación significativa ( $R^2 = 0,9881$ ,  $P < 0,01$ ) entre ambos métodos para detectar y cuantificar la presencia de *Alternaria* spp. en alimentos.

Por último, conviene señalar que todas las muestras de productos comerciales analizadas por RT-PCR en tiempo real fueron previamente analizadas por PCR en tiempo real (Tabla 10). Los recuentos obtenidos por ambos métodos fueron similares, aunque en 5 muestras de tomate desecado, una de pimiento desecado, 3 de zanahoria sana y 3 de zanahoria alterada, se observó amplificación de ADN de *Alternaria* spp. y no fueron positivas por RT-PCR. Sin embargo, los recuentos estimados en dichas muestras fueron inferiores a 15 UFC/g. Tampoco se observó señal de amplificación por RT-PCR en las 6 muestras de productos transformados de tomate que fueron positivas por PCR en tiempo real. Este hecho se explica debido a la inactivación de *Alternaria* spp. como consecuencia de los tratamientos térmicos.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la técnica de RT-PCR en tiempo real desarrollada es rápida, específica y sensible para la detección y cuantificación de *Alternaria* spp. viables en frutas y hortalizas frescas. Sin embargo, esta técnica no sería adecuada para el análisis de productos sometidos a un tratamiento térmico, ya que el ARN de *Alternaria* spp. está de-

gradado en dichos productos. La técnica de RT-PCR en tiempo real desarrollada resulta adecuada para la detección precoz de formas viables de *Alternaria* spp. en productos hortofrutícolas frescos y permitiría a las industrias alimentarias establecer medidas correctoras que eviten la presencia de micotoxinas en los productos transformados.

En definitiva en esta tesis doctoral se han desarrollado protocolos de PCR y RT-PCR en tiempo real para detectar y cuantificar *Alternaria* spp. Estos protocolos se han validado en pulpa de tomate, mostrando una

elevada especificidad y sensibilidad como se deduce del límite de detección encontrado en ambas técnicas, 1 UFC/mL. Además estos métodos muestran una buena eficiencia y eficacia en la detección y cuantificación de *Alternaria* spp. en muestras de alimentos tanto inoculadas experimentalmente como con contaminación natural. Por todo ello, se proponen estos protocolos para la enumeración de *Alternaria* spp. en materias primas y productos procesados, con el fin de evitar la producción y comercialización de alimentos contaminados con micotoxinas de *Alternaria* spp.

**Tabla 10.** Recuentos de *Alternaria* spp. estimados por PCR y RT-PCR en tiempo real a partir del análisis de productos hortofrutícolas frescos y procesados. Comparación con los recuentos de *Alternaria* spp. obtenidos por métodos convencionales.

Tipo de muestra (Nº muestras)	Recuentos de <i>Alternaria</i> spp. estimados RT-PCR (UFC/g)	Recuentos de <i>Alternaria</i> spp. estimados PCR (UFC/g)	Recuentos de <i>Alternaria</i> spp. en PCA (UFC/g)
Tomates sanos (10) <sup>a</sup>	-	-	-
Tomate alterado TA135	$1,2 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$	$2 \times 10^4$
Tomate alterado TA136	$1,0 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$2 \times 10^4$
Tomate alterado TA137	$1,4 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$2 \times 10^3$
Tomate alterado TA138	$1,1 \times 10^3$	$2,9 \times 10^3$	$2 \times 10^3$
Tomate alterado TA139	$3,5 \times 10^2$	$5,9 \times 10^2$	$6 \times 10^2$
Tomate alterado TA140	$3,9 \times 10^2$	$3,6 \times 10^2$	$6 \times 10^2$
Tomate alterado TA141	$2,3 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$	$9 \times 10^3$
Tomate alterado TA142	$3,8 \times 10^3$	$4,2 \times 10^3$	$5 \times 10^3$
Tomate alterado TA143	$1,5 \times 10^2$	$3,2 \times 10^2$	$3 \times 10^2$
Tomate alterado TA144	$5,1 \times 10^3$	$9,5 \times 10^3$	$6 \times 10^3$
Tomate enlatado TA032	-	-	-
Tomate enlatado TA035	-	$1,5 \times 10^4$	-
Tomate enlatado TA052	-	4	-
Ketchup TA036	-	-	-
Ketchup TA074	-	$5,9 \times 10^4$	-
Ketchup TA078	-	$1,2 \times 10^4$	-
Salsa de tomate (2) <sup>b</sup>	-	-	-
Salsa de tomate TA047	-	$8,8 \times 10^4$	-
Salsa de tomate TA109	-	$1,1 \times 10^4$	-
Tomate desecado (6) <sup>c</sup>	-	-	-
Tomate desecado TA123	$2,9 \times 10^3$	$8,2 \times 10^3$	$4 \times 10^3$
Tomate desecado TA124	$2,3 \times 10^3$	$9,1 \times 10^3$	$4 \times 10^3$
Tomate desecado TA125	$1,0 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$	$2 \times 10^3$
Tomate desecado TA126	$1,1 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	$2 \times 10^3$
Tomate desecado TA127	$1,6 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$	$4 \times 10^3$
Tomate desecado TA128	$2,7 \times 10^3$	$8,2 \times 10^3$	$6 \times 10^3$
Tomate desecado TA129	-	2	-
Tomate desecado TA130	-	3	-
Tomate desecado TA131	-	5	-
Tomate desecado TA145	40	71	$1 \times 10^2$
Tomate desecado TA147	2	4	10
Tomate desecado TA149	2	9	10
Tomate desecado TA151	-	4	-
Tomate desecado TA152	-	3	-
Pimiento desecado TA153	4	6	10
Pimiento desecado TA154	4	7	10
Pimiento desecado TA155	-	-	-
Pimiento desecado TA156	26	16	50
Pimiento desecado TA157	93	$1,2 \times 10^3$	$1 \times 10^3$
Pimiento desecado TA158	51	57	100
Pimiento desecado TA159	56	82	100
Pimiento desecado TA160	$7,7 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$	$1 \times 10^3$

Tabla 10. (continuación)

Tipo de muestra (Nº muestras)	Recuentos de <i>Alternaria</i> spp. estimados RT-PCR (UFC/g)	Recuentos de <i>Alternaria</i> spp. estimados PCR (UFC/g)	Recuentos de <i>Alternaria</i> spp. en PCA (UFC/g)
Pimiento desecado TA161	61	70	100
Pimiento desecado TA162	-	3	-
Pimiento desecado TA163	$2,6 \times 10^4$	$6,2 \times 10^4$	$5 \times 10^4$
Pimiento desecado TA164	$2,1 \times 10^3$	$3,8 \times 10^3$	$3 \times 10^3$
Pimiento desecado TA165	$1,0 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$	$1 \times 10^2$
Pimiento desecado TA166	$3,4 \times 10^4$	$9,1 \times 10^4$	$6 \times 10^4$
Pimiento desecado TA167	$1,4 \times 10^4$	$2,9 \times 10^4$	$2 \times 10^4$
Pimiento desecado TA168	$2,1 \times 10^4$	$4,7 \times 10^4$	$4 \times 10^4$
Pimiento desecado TA169	$6,5 \times 10^3$	$2,3 \times 10^4$	$1 \times 10^4$
Pimiento desecado TA170	$1,8 \times 10^4$	$4,7 \times 10^4$	$3 \times 10^4$
Pimiento desecado TA171	$4,6 \times 10^2$	$4,3 \times 10^3$	$3 \times 10^3$
Pimiento desecado TA172	$1,1 \times 10^4$	$2,9 \times 10^4$	$2 \times 10^4$
Zanahoria sana (7) <sup>d</sup>	-	-	-
Zanahoria sana TA187	-	15	-
Zanahoria sana TA188	-	2	-
Zanahoria sana TA190	-	4	-
Zanahoria alterada TA218	-	5	-
Zanahoria alterada TA219	3	43	10
Zanahoria alterada TA220	-	10	-
Zanahoria alterada TA221	74	$2,2 \times 10^2$	$2 \times 10^2$
Zanahoria alterada TA222	-	4	-
Fresa sana (4) <sup>e</sup>	-	-	-
Fresa sana TA195	4	8	10
Fresa alterada TA203	2	3	10
Fresa alterada TA204	$1,5 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$	$3 \times 10^2$
Fresa alterada TA205	54	$2,1 \times 10^2$	$2 \times 10^2$
Fresa alterada TA206	$1,0 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$	$2 \times 10^2$
Fresa alterada TA207	$1,5 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$2 \times 10^2$
Fresa alterada TA208	$1,3 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	$2 \times 10^2$
Fresa alterada TA209	$1,1 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$2 \times 10^2$
Fresa alterada TA210	98	$1,8 \times 10^2$	$2 \times 10^2$
Fresa alterada TA211	$2,2 \times 10^2$	$3,5 \times 10^2$	$3 \times 10^2$
Fresa alterada TA212	-	-	-
Manzana sana (5) <sup>f</sup>	-	-	-
Manzana alterada TA213	$1,5 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	$3 \times 10^2$
Manzana alterada TA214	77	$1,0 \times 10^2$	$2 \times 10^2$
Manzana alterada TA215	-	-	-
Manzana alterada TA216	59	16	$1 \times 10^2$
Manzana alterada TA217	64	37	$1 \times 10^2$

<sup>a</sup> Tomate sano: TA172, TA173, TA174, TA175, TA176, TA177, TA178, TA179, TA180 y TA181

<sup>b</sup> Salsa de tomate: TA043 y TA081

<sup>c</sup> Tomate desecado: TA132, TA133, TA134, TA146, TA148 y TA150

<sup>d</sup> Zanahoria sana: TA183, TA184, TA185, TA186, TA189, TA191 y TA192

<sup>e</sup> Fresa sana: TA193, TA194, TA196 y TA197

<sup>f</sup> Manzana sana: TA198, TA199, TA200, TA201 y TA202

(-) Indica resultados negativos para el recuento de *Alternaria* spp.





*CAPÍTULO V*  
*Conclusiones*  
*Conclusions*

---



**PRIMERA** La detección de las especies del género *Alternaria* se ha efectuado por técnicas de PCR convencional con cebadores específicos de género, diseñados en el espaciador interno de la transcripción (ITS) del ARN ribosómico y en el gen nuclear *Alt a 1*. El límite de detección alcanzado fue de  $10^2$  UFC/mL en cultivos viables e inactivados por calor, así como en muestras de alimentos frescos y procesados.

**SEGUNDA.** La técnica de PCR múltiple con cebadores diseñados en el gen *Alt a 1* ha permitido la detección del género *Alternaria* y la diferenciación de los grupos de especies de *A. alternata*, *A. porri*, *A. radicina* y *A. infectoria*. En todos los casos, el límite de detección fue de aproximadamente  $10^2$  UFC/mL.

**TERCERA.** La técnica de PCR en tiempo real con sonda TaqMan® y cebadores específicos diseñados en el marcador genético ITS, ha permitido detectar y cuantificar la presencia de ADN del género *Alternaria* en alimentos con un límite de detección de 1 UFC/mL. Esta técnica mejoró en dos órdenes de magnitud la sensibilidad de la técnica de PCR convencional, además de proporcionar una mayor rapidez y automatización a los ensayos.

**CUARTA.** La técnica de PCR en tiempo real con transcriptasa inversa (RT-PCR en tiempo real) desarrollada en el marcador genético ITS del ARNr ha permitido la detección y enumeración únicamente de células viables de las especies del género *Alternaria* en frutas y hortalizas frescas, con un límite de detección de 1 UFC/mL. Esta técnica es especialmente idónea para la detección de células viables de *Alternaria* spp. en materias primas, permitiendo a las industrias alimentarias establecer medidas correctoras que eviten la presencia de micotoxinas en los productos transformados.

**QUINTA.** La técnica de HPLC con detector de array de diodos ha permitido la detección de alternueno, alternariol y alternariol monometil éter en productos comerciales de tomate fresco y procesado, con unos límites de detección de 0,34, 3,94 y 0,074 µg/kg, respectivamente. La correlación existente entre la detección de ADN de *Alternaria* spp. y la presencia de estas micotoxinas en las muestras analizadas demuestra la utilidad de las técnicas de PCR para valorar el riesgo potencial de contaminación de los productos hortofrutícolas frescos y procesados con toxinas sintetizadas por especies del género *Alternaria*.

**SEXTA.** La aplicación de las técnicas genéticas y cromatográficas desarrolladas en este trabajo al análisis de productos hortofrutícolas frescos y procesados reveló que un alto porcentaje de tomates y pimientos desecados (mayor del 70 %) contenían ADN y micotoxinas de *Alternaria* spp, especialmente de alternariol. Asimismo, más de un tercio de los productos tratados térmicamente, especialmente de ketchup y otras salsas de tomate, contenían ADN y micotoxinas de *Alternaria*, lo que indica la utilización de materias primas enmohecidas para su fabricación. El análisis por HPLC demostró la presencia de alternueno, alternariol y/o alternariol monometil éter en el 75,6 % de las muestras que contenían ADN de *Alternaria* spp., pero ninguna de las muestras negativas por PCR contenía las micotoxinas analizadas.

**FIRST.** Detection of *Alternaria* species has been achieved using conventional PCR techniques with genus-specific primers targeting the internal transcribed spacer (ITS) ribosomal RNA and the *Alt a 1* nuclear gene. The detection limit was  $10^2$  CFU/mL in both viable and heat inactivated cultures, as well as in raw and processed foodstuffs.

**SECOND.** The multiplex PCR method developed based on primers targeting the *Alt a 1* gene, allowed the detection of DNA from *Alternaria* spp. and the identification of *A. alternata*, *A. porri*, *A. radicina* and *A. infectoria* species-groups. The detection limit was approximately  $10^2$  CFU/mL either in viable or heat inactivated cultures.

**THIRD.** The TaqMan<sup>®</sup> real-time PCR method developed using *Alternaria*-specific primers and probe targeting the Internal Transcribed Spacer (ITS) allows quantitative detection of *Alternaria* spp. DNA in foodstuffs, with a detection limit of 1 CFU/mL. Compared to the conventional PCR technique, the assay improved 100-fold the sensitivity, besides providing greater speed and automation to the trials.

**FOURTH.** The real-time reverse-transcriptase PCR method (real-time RT-PCR) targeting the ITS rRNA genetic marker, allowed the detection and enumeration of viable *Alternaria* spp. in fruits and vegetables, with a detection limit of 1 CFU/mL. This method facilitates the detection of only viable *Alternaria* spp. in raw materials, allowing the implementation of preventive and control strategies by the food industries to avoid the presence of *Alternaria* mycotoxins in processed foodstuffs.



**FIFTH.** HPLC analysis with diode-array detection (DAD) allowed the detection of altenuene, alternariol and alternariol monomethyl ether in raw or processed tomato products, with detection limits of 0.34, 3.94 and 0.074 µg/kg, respectively. The correlation between PCR detection of *Alternaria* spp. and the presence of these mycotoxins in the analysed samples demonstrates the utility of PCR techniques to assess the potential risk of contamination of raw and processed foodstuffs with *Alternaria* spp. mycotoxins.

**SIXTH.** The analysis of raw and processed fruit and vegetable products using the genetic and chromatographic techniques developed in this work showed that a high percentage (over 70 %) of dried tomatoes and peppers contained *Alternaria* spp DNA and mycotoxins, mainly alternariol. *Alternaria* DNA and mycotoxins were also detected in over one third of the heat-treated products, especially in ketchup and tomato sauces. HPLC analysis showed the presence of altenuene, alternariol and/or alternariol monomethyl ether in 75.6 % of samples containing DNA from *Alternaria* spp. Nevertheless, none of the PCR negative samples analyzed contained these mycotoxins.

*CAPÍTULO VI*  
*Trabajo Futuro*

---



## UTILIZACIÓN DE MICROARRAYS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES TOXIGÉNICAS DE *ALTERNARIA* EN ALIMENTOS

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral utilizando técnicas genéticas (PCR con cebadores específicos, PCR y RT-PCR en tiempo real) y cromatográficas (HPLC-DAD y HPLC-MS), han permitido detectar la presencia de ADN y ARN de *Alternaria* spp. y sus micotoxinas, en productos hortofrutícolas frescos y procesados. Las técnicas desarrolladas han demostrado ser adecuadas para llevar a cabo la identificación de células viables y no viables de *Alternaria* spp., así como la diferenciación de los principales grupos de especies, demostrando su gran utilidad para evaluar el riesgo potencial de contaminación de materias primas y alimentos procesados con toxinas sintetizadas por especies del género *Alternaria*. Sin embargo, presentan limitaciones para identificar específicamente cada una de las especies toxigénicas, ya que no todas las especies de *Alternaria* tienen el mismo potencial de producir micotoxinas. Este inconveniente se podría resolver mediante el desarrollo de ensayos de PCR múltiple basados en la detección de genes implicados en la síntesis de las micotoxinas de este género. Las rutas de biosíntesis, así como los genes implicados, se han estudiado e identificado en el caso de las fumonisinas (Proctor y col., 1999; Desjardins y Proctor, 2007), tricotecenos (Brown y col., 2001; McCormick y col., 2006; Desjardins, 2008), ocratoxina A (Karolewicz y Geisen, 2005; O'Callaghan y col., 2006), aflatoxinas (Degola y col., 2007; Luque y col., 2012), patulina (Luque y col.,

2011; Rodríguez y col., 2011) y zearalenona (Stepien y col., 2012). Además, se han identificado algunos genes implicados en la síntesis de micotoxinas producidas por determinados patotipos de *Alternaria*, como son las AAL toxinas, AS toxina, AF toxina, ACR toxina, ACT toxina, AK toxina y AM toxina (Tanaka y Tsuge, 2001; Ruswandi y col., 2005; Andersen y col., 2006; Harimoto y col., 2008; Li y col., 2009; Miyamoto y col., 2009; Izumi y col., 2012). Recientemente se han identificado las poliquétido sintetas implicadas en la síntesis de AOH y AME en *A. alternata* (genes *pksJ* y *pksH*) (Saha y col., 2012). Por el contrario, aunque se ha determinado la síntesis del TeA a partir de acetil Coenzima A e isoleucina (Gatenbeck y Sierankiewicz, 1973), y del ALT a partir del ácido quínico (Altemöller y col., 2006), las rutas de biosíntesis son muy poco conocidas. Por lo tanto, la identificación de especies toxigénicas de *Alternaria* mediante la detección de genes implicados en la producción de las principales micotoxinas depende de la identificación de dichos marcadores genéticos.

Los metabolitos secundarios sintetizados por los hongos se clasifican en cuatro grupos principales en función de las enzimas implicadas en su síntesis: poliquétidos, péptidos no ribosomales, terpenos y alcaloides (Keller y col., 2005). En la síntesis del ALT, AOH y AME, se piensa que están implicadas poliquétido sintetas (Ehrlich y col., 2011; Saha y col., 2012). En la síntesis del TeA se ha propuesto la implicación de poliquétido sintetas y de sintetetas de péptidos no ribosomales (Lebrun y col., 1990). Teniendo en cuenta que la implicación de las poliquétido sintetas es muy común en las rutas de bio-

síntesis de la mayoría de los metabolitos secundarios sintetizados por hongos (Saha y col., 2012), se propone continuar el trabajo de esta tesis doctoral avanzando en la identificación de secuencias de los genes que codifican las principales poliquétido sintetas implicadas en la síntesis de micotoxinas en el genoma de *Alternaria* spp. Para el desarrollo de este objetivo es necesario conocer previamente el genoma completo de las especies de *Alternaria* objeto de este estudio. En la actualidad, se están llevando a cabo proyectos de investigación para la secuenciación del genoma de *A. brassicicola* (número de acceso *NCBI*, PRJNA34523), *A. alternata* (PRJNA32537) y *A. arborescens* (PRJNA78243), sin embargo, son proyectos incipientes y todavía no se ha secuenciado el genoma completo. Una vez identificados los genes implicados en la biosíntesis de las micotoxinas de interés se diseñarán cebadores y sondas específicos para su detección.

Los sistemas de PCR en tiempo real ofrecen ventajas frente a los métodos convencionales para la cuantificación simultánea de diferentes productos de PCR. Esta característica permitiría la detección mediante PCR múltiple de diferentes especies toxigénicas de *Alternaria* empleando sondas de hibridación específicas marcadas con fluoróforos diferentes. Sin embargo, un factor limitante para el desarrollo de técnicas de PCR múltiple en tiempo real es el número de canales de detección que posee el termociclador. En este sentido, los equipos disponibles actualmente en el mercado presentan de cuatro a seis canales de lectura permitiendo la detección, como máximo, de seis marcadores genéticos en un mismo ensayo.

Estas limitaciones plantean la necesidad de desarrollar nuevos métodos que permitan llevar a cabo de forma sencilla y reproducible la detección simultánea de un elevado número de especies toxigénicas de *Alternaria* presentes en alimentos.

### Microarrays de ADN

En los últimos años, las técnicas de biología molecular han experimentado un rápido desarrollo, apareciendo nuevos métodos de análisis masivo que permiten analizar en un solo experimento miles de moléculas. Estos nuevos sistemas de análisis reciben el nombre de microarrays o biochips. Los microarrays (del griego *mikro* (pequeño) y del inglés *array* (distribución ordenada)) son sistemas de análisis que consisten en sondas de reconocimiento (proteínas, tejidos o ADN), unidas a una superficie sólida o matriz. Este sistema se pone en contacto con la muestra problema y permite el análisis simultáneo de miles de moléculas con una sensibilidad muy elevada y gran fiabilidad. Las ventajas de estas técnicas derivan de su grado de automatización, miniaturización y alta resolución, así como de su gran versatilidad y precisión, atributos de gran interés para la detección e identificación de mohos toxigénicos en los alimentos. Teniendo en cuenta estos aspectos, se propone como trabajo futuro el desarrollo de microarrays para la detección e identificación de distintas especies de *Alternaria* y de los genes implicados en las rutas biosintéticas de las micotoxinas de *Alternaria* spp. presentes en alimentos.

El origen de los microarrays se re-

monta a la miniaturización de las técnicas de afinidad que se han venido empleando desde hace años como instrumentos analíticos en el campo de la biología molecular. Los primeros ensayos de afinidad con muestras inmovilizadas sobre soportes sólidos se realizaron en la década de mil novecientos sesenta, en los que se inmovilizaban antígenos o anticuerpos sobre una superficie sólida para su detección. El siguiente paso en el desarrollo de estos dispositivos se produjo una década después, cuando Edwin Southern empleó filtros de nitrocelulosa como soporte para la fijación de moléculas de ADN capaces de hibridar con moléculas complementarias en disolución. La detección de estas hibridaciones se realizaba a través de un marcador radiactivo mediante revelado por autorradiografía. Este tipo de técnica, denominada *Southern Blot*, se extendió después al campo de la inmovilización de ARN (*Northern Blot*) y proteínas (*Western Blot*). La puesta a punto de la técnica de *Southern Blot*, dio lugar a la construcción de matrices de material biológico inmovilizado sobre superficies porosas como las membranas de nitrocelulosa o nylon. Posteriormente se comenzó a trabajar con el empleo de superficies con unos tamaños de poro más reducidos y con soportes sólidos como el vidrio y el silicio. Además, gracias al desarrollo de las técnicas de miniaturización, se disminuyó el tamaño de los puntos de material depositado sobre la superficie. De esta forma se consiguió una mayor densidad de integración en las matrices de material biológico lo cual condujo hasta el desarrollo de los microarrays. El primer microarray comercialmente disponible fue producido por la empresa Af-

fymetrix en el año 1994, con una capacidad de 16 000 sondas. Posteriormente al nacimiento de la tecnología desarrollada por Affymetrix han aparecido nuevas compañías y nuevos desarrollos que han permitido alcanzar un alto grado de diversidad tecnológica.

En la actualidad se distinguen diversos tipos de microarrays clasificados en función de criterios diversos como el tipo de material inmovilizado o el material de soporte utilizado. Según el tipo de material inmovilizado, estos dispositivos se clasifican de forma general en:

- Microarrays de ADN. Este tipo de chips tienen inmovilizados en la superficie fragmentos de material genético que pueden ser cadenas de oligonucleótidos cortos (de unas 25 pb aproximadamente) o largos (de entre 50-70 pb), ADNc (ADN complementario sintetizado a partir de ARNm), o bien productos de PCR. Son los más utilizados en el campo de la investigación biotecnológica.
- Microarrays de proteínas (*Protein chips*). Se trata de un soporte sobre el que se fijan distintas proteínas, generalmente anticuerpos. Estos sistemas permiten detectar simultáneamente y de forma eficaz los niveles de proteínas presentes en muestras complejas como suero o cultivos celulares. Asimismo, permiten la observación global de actividades bioquímicas de miles de proteínas, como las interacciones con otros sustratos (proteínas, ADN y moléculas peque-

ñas). La fabricación de este tipo de arrays es más compleja y costosa que la de los microarrays de ADN, debido a la dificultad para fabricar e inmovilizar estructuras tridimensionales como son las proteínas, por lo que su uso no está tan extendido.

- Microarrays de tejidos (*Tissue chips* o TMA). Sobre la superficie de estos chips lo que se inmovilizan son pequeñas muestras de tejido para llevar a cabo análisis en paralelo de varias muestras o ensayos múltiples sobre una misma muestra. Proporcionan un nuevo método de alto rendimiento para estudiar el perfil molecular, la expresión del ARNm o el análisis de las alteraciones cromosómicas mediante hibridación *in situ* de múltiples muestras de tejido simultáneamente. Este tipo de arrays está considerado hoy en día una potente herramienta para el análisis masivo del perfil molecular del cáncer. Otras aplicaciones importantes de estos chips son el análisis toxicológico y la búsqueda de agentes patógenos.

Por otra parte, en función del soporte empleado y el tipo de unión, se pueden distinguir tres tipos de chips:

- Chips "*glass-based*". Son chips en los que el material se encuentra covalentemente inmovilizado a la superficie sólida que le sirve de soporte y que puede ser cristal o cualquier otra superficie como silicio, plástico u oro.
- Chips "*gel-based*". Son chips en los que las interacciones entre el mate-

rial a inmovilizar y el soporte sólido de inmovilización no tiene carácter covalente. Los soportes más comúnmente empleados son pequeñas porciones de geles, o membranas porosas de nylon o nitrocelulosa presentes sobre portaobjetos de cristal.

- Chips "*electronic-based*". Son chips contruidos sobre electrodos en los que se llevan a cabo las reacciones. A diferencia del resto de arrays, en los que la hibridación es un proceso pasivo y aleatorio, en el caso de los chips microelectrónicos se genera un campo eléctrico que dirige activamente la muestra, incrementando su concentración sobre las sondas, y por tanto, aumentando la efectividad del proceso. Además, este sistema permite hibridaciones seriadas de distintas muestras o bien de una muestra sobre diferentes combinaciones de sondas.

Otros criterios de clasificación de microarrays hacen referencia al diseño del biochip (personalizado o industrial), la forma de fabricación (síntesis *in situ* de las moléculas de interés sobre el propio microarray o síntesis por deposición de moléculas sintetizadas previamente), o bien a la utilidad perseguida con su utilización (secuenciación, expresión génica, hibridación comparativa, etc.).

Las aplicaciones más conocidas de los microarrays son en el ámbito de la biomedicina, destacando su utilidad en la identificación de dianas terapéuticas (Mousses y col., 2002; Sauter y col., 2003; Wang y col.,



2004), desarrollo de fármacos (Scherf y col., 2000; Turton y col., 2001), diagnóstico clínico (Bryant y col., 2004; Doménech-Sánchez y Vila, 2004) y farmacogenómica y farmacogenética (Cigudosa, 2004). En el campo de los alimentos, estas técnicas se han utilizado para la detección de organismos modificados genéticamente (OMGs) en alimentos procesados (Chen y col., 2006; Hamels y col., 2009), así como en la identificación de especies animales y vegetales en alimentos y piensos (Peter y col., 2004; Rønning y col., 2005; Chisholm y col., 2008; Teletchea y col., 2008; Prins y col., 2010). Por último, estas técnicas se han utilizado en la identificación de especies toxigénicas pertenecientes a diversos géneros fúngicos frecuentemente aislados de alimentos, así como para la detección de genes implicados en la síntesis de fumonisinas, aflatoxinas, ocratoxina A, patulina y tricotecenos (Kristensen y col., 2007; Schmidt-Heydt y Geisen, 2007; Lezar y Barros, 2010). Sin embargo, las técnicas de microarrays desarrolladas en estos estudios no han tenido en cuenta la identificación de especies del género *Alternaria*.

En este contexto, este trabajo propone el empleo de microarrays de oligonucleótidos cortos (20-25 pb) para la detección e identificación de las principales especies micotoxigénicas de *Alternaria* presentes en alimentos. El sistema propuesto consiste en una colección de oligonucleótidos inmovilizados en un soporte rígido no poroso, destinados a reconocer específicamente determinadas secuencias de ADN diana previamente amplificadas por PCR a partir de la muestra problema.

La metodología del trabajo a seguir sería la siguiente:

- Seleccionar marcadores genéticos adecuados que sirvan de molde para el diseño de las sondas de reconocimiento en regiones internas a los correspondientes productos amplificados. Para la identificación a nivel de especie, se proponen como marcadores el espaciador interno de la transcripción (ITS) del ARNr, el espaciador intergénico (IGS), el gen *Alt a 1* y el gen codificador del factor de elongación 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), ya que presentan altos niveles de variabilidad entre especies del mismo género, permitiendo la identificación de especies muy relacionadas filogenéticamente, y mostrando incluso variabilidad intraespecífica. Para la detección de especies capaces de producir micotoxinas, se proponen como marcadores los genes implicados en las rutas biosintéticas de las micotoxinas de *Alternaria* spp. descritos en la bibliografía. Por último, para facilitar la interpretación de los resultados negativos se utilizarán también controles internos de amplificación (gen 18S ARNr).
- Diseñar y sintetizar sondas de oligonucleótidos. Las sondas cortas (25-35 pb) internas a cada uno de los amplicones seleccionados, deberán diseñarse en zonas que contengan suficientes diferencias en sus secuencias como para permitir la detección específica de las especies diana. Para el diseño de las sondas, se

empleará el software *Oligo Design* (<http://www.enme.umd.edu/bioengineering>), ya que este programa automatiza algunas etapas del proceso que mejoran la elección de las sondas.

- Poner a punto las técnicas de microarrays de ADN para la detección específica de las especies seleccionadas en productos hortofrutícolas frescos y procesados. Para ello será necesario:
  - Construir los microarrays de oligonucleótidos. Cada chip estará formado por las sondas previamente sintetizadas y depositadas en *spot* sobre un soporte de vidrio. En este formato cada *spot* representa un gen y está constituido por un grupo de sondas.
  - Preparar y marcar el ADN diana. Empleando el ADN extraído a partir de cultivos de las especies de *Alternaria* objeto de estudio se pondrán a punto las amplificaciones por PCR de los fragmentos genéticos seleccionados.
  - Los amplicones obtenidos se marcarán con un fluorocromo para su posterior incubación sobre el panel de sondas del chip.
  - Hibridación de los microarrays y visualización de las reacciones.

En la hibridación, el material obtenido de las muestras convenientemente tratado y marcado se pondrá en contacto con el array, produciéndose una reacción de afinidad entre las hebras de ADN de las sondas inmovilizadas en la superficie del chip y sus cadenas complementarias presentes en las muestras a investigar. A continuación, se someterán los arrays a una serie de lavados para eliminar hibridaciones inespecíficas entre la muestra y el material inmovilizado o la superficie del biochip. Posteriormente, se procederá a la medición de la señal mediante un escáner.

- Analizar los resultados obtenidos. Tras la detección de la señal, se analizarán las imágenes obtenidas para la obtención de los resultados numéricos utilizando programas informáticos específicos.
- Utilizar los ensayos desarrollados para analizar productos hortofrutícolas frescos y procesados a fin de comprobar la aplicabilidad de los microarrays para determinar la presencia de especies de *Alternaria* en alimentos.

*CAPÍTULO VII*  
*Bibliografía*

---



- AARTS, H. y KEIJER, J. (1999). Genomic fingerprinting of microorganisms by automatic laser fluorescence analysis (ALFA) of amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Molecular Microbial Ecology Manual** 3, 9-10.
- ABD EL-AAL, S.S. (1997). Effects of gamma radiation, temperature and water activity on the production of *Alternaria* mycotoxins. **Egyptian Journal of Microbiology** 32, 379-396.
- ABEBE, M., KUZMAR, V., RAJAN, S., THAKER, A., SEVINE, S. y VIJAY, H.M. (2006). Detection of recombinant Alt a 1 in a two-site, IgM based, sandwich ELISA opens up possibilities of developing alternative assays for the allergen. **Journal of Immunological Methods** 312, 111-117.
- ACHATZ, G., OBERKOFER, H., LECHENAUER, E., SIMON, B., UNGER, A., KANDLER, D., EBNER, C., KRAFT, D. y BREITENBACH, M. (1996). Molecular characterization of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum* allergens. **Advances in Experimental Medicine and Biology** 409, 157-161.
- ACKERMANN, Y., CURTUI, V., DIETRICH, R., GROSS, M., LATIF, H., MÄRTLBAUER, E. y USLEBER, E. (2011). Widespread occurrence of low levels of alternariol in apple and tomato products, as determined by comparative immunochemical assessment using monoclonal and polyclonal antibodies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 59, 6360-6368.
- AFSAH-HEJRI, L., JINAP, S., ARZANDEH, S. y MIRHOSSEINI, H. (2011). Optimization of HPLC conditions for quantitative analysis of aflatoxins in contaminated peanut. **Food Control** 22, 381-388.
- ALONSO, F. (2008). El cultivo de la patata. Mundi-Prensa (Ed.), Barcelona, España.
- ALTEMÖLLER, M., PODLECH, J. y FENSKE, D. (2006). Total synthesis of altenuene and isoaltenuene. **European Journal of Organic Chemistry** 7, 1678-1684.
- AN, Y., ZHAO, T., MIAO, J., LIU, G., ZHENG, Y., XU, Y. y VAN ETTEN, R.L. (1989). Isolation, identification, and mutagenicity of alternariol monomethyl ether. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 37, 1341-1343.
- ANDRÉS, M.F., DURAN-VILA, N., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., JORDÁ, M.C., LÓPEZ, M.M. y MELGAREJO, P. (2010). Patógenos de plantas descritos en España, 2ª ed. Sociedad Española de Fitopatología. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (Ed.), Madrid, España.
- ANDERSEN, B., DONGO, A. y PRYOR, B.M. (2008). Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. tomatophila*. **Mycological Research** 112, 241-250.
- ANDERSEN, B. y FRISVAD, J. (2004). Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 52, 7507-7513.
- ANDERSEN, B., KROGER, E. y ROBERTS, R.G. (2001). Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. **Mycological Research** 105, 291-299.
- ANDERSEN, B., KROGER, E. y ROBERTS, R.G. (2002). Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria*, and *A. tenuissima* species-groups. **Mycological Research** 106, 170-182.
- ANDERSEN, B., SMEDSGAARD, J., JORRING, I., SKOUBOE, P. y PEDERSEN, L.H. (2006). Real-time PCR quantification of the AM-toxin gene and HPLC qualification of toxigenic metabolites from *Alternaria* species from apples. **International Journal of Food Microbiology** 111, 105-111.
- ANDERSEN, B., SORENSEN, J.L., NIELSEN, K.F., VAN DEN ENDE, B.G. y DE HOOG, S. (2009). A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectoria* species-group. **Fungal Genetics and Biology** 46, 642-656.
- ANDERSEN, B., THRANE, U., SVENDSEN, A. y RASMUSSEN, I.A. (1996). Associated field mycobiota on malt barley. **Canadian Journal of Botany** 74, 854-858.
- ARADHYA, M.K., CHAN, H.M. y PARFITT, D.E. (2001). Genetic variability in the pistachio late blight fungus *Alternaria alternata*. **Mycological Research** 105, 300-306.
- ARESTA, A., CIOFFI, N., PALMISANO, F. y ZAMBONIN, C.G. (2003). Simultaneous determina-

- tion of ochratoxin A and cyclopiazonic, mycophenolic, and tenuazonic acids in cornflakes by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51, 5232-5237.
- ASAM, S., KONITZER, K. y RYCHLIK, M. (2010). Precise determination of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in cereal, fruit and vegetable products using stable isotope dilution assays. **Mycotoxin Research** 27, 23-28.
- ASAM, S., KONITZER, K., SCHIEBERLE, P. y RYCHLIK, M. (2009). Stable isotope dilution assays of alternariol and alternariol monomethyl ether in beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 57, 5152-5160.
- ASTURIAS, J.A., ARILLA, M.C., IBARROLA, I., ERASO, E., GONZÁLEZ-RIOJA, R. y MARTÍNEZ, A. (2003). A sensitive two-site enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of the major *Alternaria alternata* allergen Alt a 1. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology** 90, 529-535.
- ASTURIAS, J.A., IBARROLA, I., FERRER, A., ANDREU, C., LÓPEZ-PASCUAL, E., QUIRALTE, J., FLORIDO, F. y MARTÍNEZ, A. (2005). Diagnosis of *Alternaria alternata* sensitization with natural and recombinant Alt a 1 allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 115, 1210-1217.
- AS'WAD, A.W.M., SARIAH, M., PATERSON, R.R.M., ABIDIN, M.A.Z. y LIMA, N. (2011). Ergosterol analyses of oil palm seedlings and plants infected with *Ganoderma*. **Crop Protection** 30, 1438-1442.
- ATOUI, A., EL KHOURY, A., KALLASSY, M. y LEBRIHI, A. (2012). Quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* by real-time PCR system and zearalenone assessment in maize. **International Journal of Food Microbiology** 154, 59-65.
- AUTORIDAD EUROPEA DE SEGURIDAD ALIMENTARIA (EFSA). (2011). Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. **EFSA Journal** 9, 2407.
- AZCARATE, M.P., PATRIARCA, A., TERMINIELLO, L. y FERNÁNDEZ, V. (2008). *Alternaria* toxins in wheat during the 2004 to 2005 Argentinean harvest. **Journal of Food Protection** 71, 1262-1265.
- BAO, L., OLES, C.J., WHITE, K.D., SAPP, C. y TRUCKSESS, M.W. (2011). Use of a multifunctional column for the determination of deoxynivalenol in grains, grain products, and processed foods. **Journal of AOAC International** 94, 1506-1512.
- BARKAI-GOLAN, R. (2008). *Alternaria* mycotoxins. En: *Mycotoxins in fruits and vegetables*. Barkai-Golan, R. y Nachman, P. (Eds.). San Diego, Estados Unidos.
- BARKAI-GOLAN, R. y PASTER, N. (2008). Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 1. **World Mycotoxin Journal** 1, 147-159.
- BARRANCO, D., FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R. y RALLO, L. (2004). El cultivo del olivo. Mundi-Prensa (Ed.), Madrid, España.
- BARRETO, R.W., SANTIN, A.M. y VIEIRA, B.S. (2008). *Alternaria cichorii* in Brazil on *Cichorium* spp. seeds and cultivated and weedy hosts. **Journal of Phytopathology** 156, 425-430.
- BARROS, G.G., OVIEDO, M.S., RAMIREZ, M.L. y CHULZE, S.N. (2011). Safety aspects in soybean food and feed chains: fungal and mycotoxins contamination. En: *Soybean: biochemistry, chemistry and physiology*. Tzi-Bun, N. (Ed.). InTech, Croacia.
- BASU, P.K. (1974). Measuring early blight, its progress and influence on fruit losses in nine tomato cultivars. **Canadian Plant Disease Survey** 54, 45-51.
- BECERRA, S., MEDINA, V.M., GARZA, J.G. y OROZCO, M. (1988). Citrus leaf spot, a new Mexican lime disease: a review. **Proceedings International Society Citriculture** 6, 795-800.
- BEN AMAR, A., OUESLATI, S., GHORBEL, A. y MLIKI, A. (2012). Prediction and early detection of mycotoxigenic *Fusarium culmorum* in wheat by direct PCR-based procedure. **Food Control** 23, 506-510.
- BENNETT, J.W. y KLICH, M. (2003). Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews** 16, 497-516.
- BENSASSI, F., ZID, M., RHOUMA, A., BACHA, H. y HAJLAOUI, M.R. (2009). First report of *Alternaria* species associated with black point of wheat in Tunisia. **Annals of Microbiology** 59, 465-467.

- BERTHILLER, F., DALL'ASTA, C., SCHUHMACHER, R., LEMMENS, M., ADAM, G. y KRSKA, R. (2005). Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53, 3421-3425.
- BERTONI, P., GHIRETTI, G.P., SANDEI, L., STRINA, F. y LEONI, C. (1994). Ergosterol content of commercial tomato products as an index of raw material fungal contamination and proposal of a tolerance value. **Industria Conserve** 69, 18-25.
- BEUCHAT, L.R. y COUSIN, M.A. (2002). Yeast and molds. American Public Health Association (Ed.), Washington, Estados Unidos.
- BLEVE, G., RIZZOTI, L., DELLAGIO, F. y TORRIANI, S. (2003). Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yoghurts and pasteurized food products. **Applied and Environmental Microbiology** 69, 4116-4122.
- BOEDO, C., BERRUYER, R., LECOMTE, M., BERSIHAND, S., BRIARD, M., LE CLERC, V., SIMONEAU, P. y POUPARD, P. (2010). Evaluation of different methods for the characterization of carrot resistance to the *Alternaria* leaf blight pathogen (*Alternaria dauci*) revealed two qualitatively different resistances. **Plant Pathology** 59, 368-375.
- BOGS, C., BATTILANI, P. y GEISEN, R. (2006). Development of a molecular detection and differentiation system for ochratoxin A producing *Penicillium* species and its application to analyse the occurrence of *Penicillium nordicum* in cured meats. **International Journal of Food Microbiology** 107, 39-47.
- BOTTALICO, A. y LOGRIECO, A. (1998). Toxicogenic *Alternaria* species of economic importance. En: Mycotoxins in agriculture and food safety. Sinha, K.K. y Bhatnagar, D. (Eds.). Nueva York, Estados Unidos.
- BREITENBACH, M. y SIMON-NOBBE, B. (2002). The allergens of *Cladosporium herbarum* and *Alternaria alternata*. **Chemical Immunology** 81, 48-72.
- BROWN, D.W., MCCORMICK, S.P., ALEXANDER, N.J., PROCTOR, R.H. y DESJARDINS, A.E. (2001). A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. **Fungal Genetics Biology** 32, 121-133.
- BRYANT, P.A., VENTER, D., ROBINS-BROWNE, R. y CURTIS, N. (2004). Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases. **Lancet Infectious Diseases** 4, 100-111.
- BRZONKALIK, K., HERRLING, T., SYLDATK, C. y NEUMANN, A. (2011). The influence of different nitrogen and carbon sources on mycotoxin production in *Alternaria alternata*. **International Journal of Food Microbiology** 147, 120-126.
- BULLERMAN, L.B. y GOURAMA, H. (2001). Toxicogenic fungi and fungal toxins. En: Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4ª ed. Downer, F.P. e Ito, K. (Eds.). Washington, Estados Unidos.
- BURKIN, A.A. y KONONENKO, G.P. (2011). Enzyme immunoassay of alternariol for the assessment of risk of agricultural products contamination. **Applied Biochemistry and Microbiology** 47, 72-76.
- CASTELLÁ, G. y CABAÑES, F.J. (2011). Development of a real time PCR system for detection of ochratoxin A-producing strains of the *Aspergillus niger* aggregate. **Food Control** 22, 1367-1372.
- CELLI, M.G., COELHO, A.R., WOSIACKI, G., BOSCOLO, M. y GARCÍA-CRUZ, C.H. (2009). Patulin determination in apples with rotten areas. **World Mycotoxin Journal** 2, 279-283.
- CHAERANI, R. y VOORRIPS, R.E. (2006). Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen, genetics, and breeding for resistance. **Journal of General Plant Pathology** 72, 335-347.
- CHAKRABORTY, B.N., DAS-BISWAS, R. y SHARMA, M. (2006). *Alternaria alternata* - a new foliar fungal pathogen of tea in North Bengal, India. **Plant Pathology** 55, 303.
- CHELKOWSKI, J. y VISCONTI, A. (1992). *Alternaria*. Biology, plant diseases and metabolites. Elsevier (Ed.), Amsterdam, Holanda.
- CHEN, T.L., SANJAYA, PRASAD, V., LEE, C.H., LIN, K.H., CHIUEH, L.C. y CHAN, M.T. (2006). Validation of cDNA microarray as a prototype for



- throughput detection of GMOs. **Botanical Studies** 47, 1-11.
- CHEN, W., SHARMA, H.C. y MUEHLBAUER, F.J. (2011). Compendium of chickpea and lentil diseases and pests. APS press (Ed.), St. Paul, Estados Unidos.
- CHISHOLM, J., CONYERS, C.M. y HIRD, H. (2008). Species identification in food products using the bioMerieux Food Expert-ID R system. **European Food Research and Technology** 228, 39-45.
- CHOU, H.H. y WU, W.S. (2002). Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. **Mycological Research** 106, 164-169.
- CHRISTENSEN, K.B., VAN KLINK, J.W., WEAVERS, R.T., LARSEN, T.O., ANDERSEN, B. y PHIPPS, R.K. (2005). Novel chemotaxonomic markers for the *Alternaria infectoria* species-group. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53, 9431-9435.
- CHULZE, S.N., RAMIREZ, M.L., TORRES, A. y LESLIE, J.F. (2000). Genetic variation in *Fusarium* section *Liseola* from no-till maize in Argentina. **Applied and Environmental Microbiology** 66, 5312-5315.
- CIGUDOSA, J.C. (2004). The microarray revolution in biomedical research: types of platforms, uses and perspectives in oncology. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra** 27, 11-20.
- CIPRIANI, M.G., STEA, G., MORETTI, A., ALTOMARE, C., MULÉ, G. y VURRO, M. (2009). Development of a PCR-based assay for the detection of *Fusarium oxysporum* strain FT2, a potential mycoherbicide of *Orobancha ramosa*. **Biological Control** 50, 78-84.
- CLEAR, R.M., PATRICK, S.K. y GABA, D. (2000a). Prevalence of fungi and fusariotoxins on barley seed from western Canada, 1995 to 1997. **Canadian Journal of Plant Pathology** 22, 44-50.
- CLEAR, R.M., PATRICK, S.K. y GABA, D. (2000b). Prevalence of fungi and fusariotoxins on oat seed from western Canada, 1995-97. **Canadian Journal of Plant Pathology** 22, 310-314.
- COMBINA, M., DALCERO, A., VARSAVSKY, E., TORRES, A., ETCHEVERRY, M., RODRIGUEZ, M. y GONZÁLEZ, H. (1999). Effect of heat treatments on stability of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in sunflower flour. **Mycotoxin Research** 15, 33-38.
- COMISIÓN EUROPEA. (2006a). Reglamento (CE) nº 401/2006 de la Comisión de 23 de febrero de 2006, por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. **Diario Oficial de la Unión Europea** L70, 12.
- COMISIÓN EUROPEA. (2006b). Reglamento (CE) nº 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. **Diario Oficial de la Unión Europea** L364, 5.
- COMISIÓN EUROPEA. (2007). Reglamento (CE) nº 1126/2007 de la Comisión de 28 de septiembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) nº 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios por lo que se refiere a las toxinas de *Fusarium* en el maíz y los productos del maíz. **Diario Oficial de la Unión Europea** L255, 14-17.
- COMISIÓN EUROPEA. (2010a). Reglamento (CE) nº 105/2010 de la Comisión de 5 de febrero de 2010, que modifica el Reglamento (CE) nº 1881/2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios por lo que se refiere a la ocratoxina A. **Diario Oficial de la Unión Europea** L35, 7-8.
- COMISIÓN EUROPEA. (2010b). Reglamento (CE) nº 165/2010 de la Comisión de 26 de febrero de 2010, que modifica, en lo que respecta a las aflatoxinas, el Reglamento (CE) nº 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. **Diario Oficial de la Unión Europea** L50, 8-12.
- Comité de Científicos Alimentarios de la República Checa (CSCF). (2008). Disponible en: <http://www.chpr.szu.cz>.
- CRAMER, R.A. y LAWRENCE, C.B. (2003). Cloning of a gene encoding an Alt a 1 isoallergen differentially expressed by the necrotrophic fungus *Alternaria*

- brassicicola* during *Arabidopsis* infection. **Applied and Environmental Microbiology** 69, 2361-2364.
- CUNNINGTON, J.H., MINCHINTON, E.J., AUER, D.P.F. y MARTIN, H.L. (2007). First record of *Alternaria petroselinii* sensu lato causing leaf blight on parsley in Australia. **Plant Pathology** 56, 723.
- DACHOUPAKAN, C., RATOMAHENINA, R., MARTINEZ, V., GUIRAUD, J.P., BACCOU, J.C. y SCHORR-GALINDO, S. (2009). Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilli isolated from grapes. **International Journal of Food Microbiology** 132, 14-23.
- D'AMATO, G., CHATZIGEORGIOU, G., CORSICO, R., GIOULEKAS, D., JAEGER, L., JAEGER, S., KONTOU-FILI, K., KOURIDAKIS, S., LICCARDI, G., MERIGGI, A., PALMA-CARLOS, A., PALMA-CARLOS, M.L., ALEMAN, A., PARMIANI, S., PUCCINELLI, P., RUSSO, M., SPIEKSMAN, F., TORRICELLI, R. y WUTHRICH, B. (1997). Evaluation of the prevalence of prick skin test positively to *Alternaria* and *Cladosporium* in patients with suspected respiratory allergy. **Allergy** 52, 711-716.
- DA MOTTA, S. y SOARES, L.M.V. (2000a). A method for the determination of two *Alternaria* toxins, alternariol and alternariol monomethyl ether, in tomato products. **Brazilian Journal of Microbiology** 31, 315-320.
- DA MOTTA, S. y SOARES, L.M.V. (2000b). Simultaneous determination of tenuazonic and cyclopiazonic acids in tomato products. **Food Chemistry** 71, 111-116.
- DA MOTTA, S. y SOARES, L.M.V. (2001). Survey of Brazilian tomato products for alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and cyclopiazonic acid. **Food Additives and Contaminants** 18, 630-634.
- DATAR, V.V. y MAYEE, C.D. (1985). Assessment of losses in tomato yield due to early blight. **Indian Phytopathology** 34, 191-195.
- DAVIS, V.M. y STACK, M.E. (1994). Evaluation of alternariol and alternariol methyl ether for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. **Applied and Environmental Microbiology** 60, 3901-3902.
- DEGOLA, F., BERNI, E., DALL'ASTA, C., SPOTTI, E., MARCHELLI, R., FERRERO, I. y RESTIVO, F.M. (2007). A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. **Journal of Applied Microbiology** 103, 409-417.
- DEGOLA, F., BERNI, E., SPOTTI, E., FERRERO, I. y RESTIVO, F.M. (2009). Facing the problem of "false positives": Re-assessment and improvement of a multiplex RT-PCR procedure for the diagnosis of *A. flavus* mycotoxin producers. **International Journal of Food Microbiology** 129, 300-305.
- DE HOOG, G.S. y HORRE, R. (2002). Molecular taxonomy of the *Alternaria* and *Ulocladium* species from humans and their identification in the routine laboratory. **Mycoses** 45, 259-276.
- DELGADO, T. y GÓMEZ-CORDOVÉS, C. (1998). Natural occurrence of alternariol and alternariol methyl ether in Spanish apple juice concentrates. **Journal of Chromatography A** 815, 93-97.
- DELGADO, T., GÓMEZ-CORDOVÉS, C. y SCOTT, P.M. (1996). Determination of alternariol and alternariol methyl ether in apple juice using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A** 731, 109-114.
- DE OLIVEIRA, L., REIS, G.M., DA SILVA, V.N., BRAGHINI, R., TEIXEIRA, M.M.G. y CORREA, B. (2011). Molecular characterization and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* isolated from corn grains of different geographic origins in Brazil. **International Journal of Food Microbiology** 145, 9-21.
- DESJARDINS, A.E. (2008). Natural product chemistry meets genetics: When is a genotype a chemotype? **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56, 7587-7592.
- DESJARDINS, A.E. y PROCTOR, R.H. (2007). Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. **International Journal of Food Microbiology** 119, 47-50.
- DE VOUGE, M.W., THAKER, A.J., ZHANG, L., MURADIA, G., RODE, H. y VIJAY, H.M. (1998). Molecular cloning of Ig-E binding fragments of *Alternaria alternata* allergens. **International Archives of Allergy and Immunology** 116, 261-268.

- DIGUTA, C.F., ROUSSEAU, S., WEIDMANN, S., BRETIN, N., VINCENT, B., GUILLOUX-BENATIER, M. y ALEXANDRE, H. (2010). Development of a qPCR assay for specific quantification of *Botrytis cinerea* on grapes. **FEMS Microbiology Letters** 313, 81-87.
- DIGUTA, C.F., VINCENT, B., GUILLOUX-BENATIER, M., ALEXANDRE, H. y ROUSSEAU, S. (2011). PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. **Food Microbiology** 28, 1145-1154.
- DI MAVUNGU, J., MONBALIU, S., SCIPPO, M.L., MAGHUIN, G., SCHNEIDER, Y.J., LARONDELLE, Y., CALLEBAUT, A., ROBBENS, J., VAN PETEGHEM, C. y DE SAEGER, S. (2009). LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements. **Food Additives and Contaminants** 26, 885-895.
- DINI-ANDREOTE, F., PIETROBON, V.C., ANDREOTE, F.D., ROMAO, A.S., SPOSITO, M.B. y ARAUJO, W.L. (2009). Genetic variability of Brazilian isolates of *Alternaria alternata* detected by AFLP and RAPD techniques. **Brazilian Journal of Microbiology** 40, 670-677.
- DOMBRINK-KURTZMAN, M.A. y MCGOVERN, A.E. (2007). Species-specific identification of *Penicillium* linked to patulin contamination. **Journal of Food Protection** 70, 2646-2650.
- DOMÉNECH-SÁNCHEZ, A. y VILA, J. (2004). Fundamento, tipos y aplicaciones de los arrays de ADN en la microbiología médica. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica** 22, 46-54.
- DORAK, M.T. (2006). Real-time PCR. BIOS Advanced Methods Series. Taylor & Francis (Ed.), Londres, Reino Unido.
- DOSTER, M.A. y MICHAILLIDES, T.J. (2007). Fungal decay of first-crop and main-crop figs. **Plant Disease** 91, 1657-1662.
- DUGAN, F.M. y PEEVER, T.L. (2002). Morphological and cultural differentiation of described species of *Alternaria* from *Poaceae*. **Mycotaxon** 83, 229-264.
- EDEL, V., STEINBERG, C., GAUTHERON, N. y ALABOUVETTE, C. (1997). Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR)-amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. **Mycological Research** 101, 179-187.
- ELLIS, M.B. y ELLIS, J.P. (1997). Microfungi on land plants. An Identification Handbook. Enlarged Edition. The Richmond Publishing Co. Ltd (Ed.), Reino Unido.
- EHRlich, K.C. CHANF, P.K. y BHATNAGAR, D. (2011). Mycotoxins. eLS. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000373.pub2.
- ESCUREDO, O., SEIJO, M.C., FERNÁNDEZ, M. e IGLESIAS, I. (2011). Effects of meteorological factors on the levels of *Alternaria* spores on a potato crop. **International Journal of Biometeorology** 55, 243-252.
- FARRAR, J.J., PRYOR, B.M. y DAVIS, R.M. (2004). *Alternaria* diseases of carrot. **Plant Disease** 88, 776-784.
- FAVIS, R.M. y RAID, N. (2002). Compendium of umbelliferous crop diseases. APS press (Ed.), St. Paul, Estados Unidos.
- FENTE, C.A., JAIMEZ, J., VÁZQUEZ, B.I., FRANCO, C.M. y CEPEDA, A. (1998). Determination of alternariol in tomato paste using solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analyst** 123, 2277-2280.
- FERNÁNDEZ, M.R., CLARKE, J.M. y DEPAUW, R.M. (2000). Blackpoint reactions of common and durum wheat cultivars grown under irrigation in southern Saskatchewan. **Plant Disease** 84, 892-894.
- FERNÁNDEZ, M.R. y HOLZGANG, G. (2009). Fungal populations in subcrown internodes and crowns of oat crops in Saskatchewan. **Canadian Journal of Plant Science** 89, 549-557.
- FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D., ATKINS, S.L. y FRAAIJE, B.A. (2011). The use of a CYP51C gene based PCR-RFLP assay for simultaneous detection and identification of *Fusarium avenaceum* and *F. tricinatum* in wheat. **International Journal of Food Microbiology** 145, 370-374.
- FERRER, C., MONTERO, J., ALIÓ, J.L., ABAD, J.L., RUIZ-MORENO, J.M. y COLOM, F. (2003). Rapid molecular diagnosis of posttraumatic keratitis and

- endophthalmitis caused by *Alternaria infectoria*. **Journal of Clinical Microbiology** 41, 3358-3360.
- FERRER, C., MUÑOZ, G., ALIÓ, J.L., ABAD, J.L. y COLOM, F. (2002). Polymerase chain reaction diagnosis in fungal keratitis caused by *Alternaria alternata*. **American Journal of Ophthalmology** 133, 398-399.
- FLECK, S.C., BURKHARDT, B., PFEIFFER, E. y METZLER, M. (2012). *Alternaria* toxins: Alternotoxin II is a much stronger mutagen and DNA strand breaking mycotoxin than alternariol and its methyl ether in cultured mammalian cells. **Toxicology Letters** 214, 27-32.
- FOOLAD, M.R., MERK, H.L. y ASHRAFI, H. (2008). Genetics, genomics and breeding of late blight and early blight resistance in tomato. **Critical Reviews in Plant Sciences** 27, 75-107.
- FREDLUND, E., GIDLUND, A., PETTERSSON, H., OLSEN, M. y BORJESSON, T. (2010). Real-time PCR detection of *Fusarium* species in Swedish oats and correlation to T-2 and HT-2 toxin content. **World Mycotoxin Journal** 3, 77-88.
- FREDLUND, E., THIM, A.M., GIDLUND, A., BROSTEDT, S., NYBERG, M. y OLSEN, M. (2009). Moulds and mycotoxins in rice from the Swedish retail market. **Food Additives and Contaminants** 26, 527-533.
- FRISVAD, J.C. (1983). A selective and indicative medium for groups of *Penicillium viridicatum* producing different mycotoxins on cereals. **Journal of Applied Bacteriology** 54, 409-416.
- FRISVAD, J.C., THRANE, U. y SAMSON, R.A. (2007). Mycotoxin producers. En: Food mycology: a multifaceted approach to fungi and food. Dijksterhuis, J. y Samson, R.A. (Eds.). Boca Raton, Estados Unidos.
- GANNIBAL, P.B., KLEMSDAL, S.S. y LEVITIN, M.M. (2007). AFLP analysis of Russian *Alternaria tenuissima* populations from wheat kernels and other hosts. **European Journal of Plant Pathology** 119, 175-182.
- GARCÍA, C., LA GUERCHE, S., MOUHAMADOU, B., FÉRANDON, C., LABARÈRE, J., BLANCARD, D., DARRIET, P. y BARROSO, G. (2006). A CAPS test allowing a rapid distinction of *Penicillium expansum* among fungal species collected on grape berries, inferred from the sequence and secondary structure of the mitochondrial SSU-rRNA. **International Journal of Food Microbiology** 111, 183-190.
- GASHGARI, R.M., SHEBANY, Y.M. y GHERBAWY, Y.A. (2011). Molecular characterization of ochratoxigenic fungi associated with raisins. **Foodborne Pathogens and Disease** 8, 1221-1227.
- GATENBECK, S. y SIERANKIEWICZ, J. (1973). On the biosynthesis of tenuazonic acid in *Alternaria tenuis*. **Acta Chemica Scandinavica** 27, 1825-1827.
- GESSNER, M.O. y CHAUVET, E. (1993). Ergosterol to biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. **Applied and Environmental Microbiology** 59, 502-507.
- GIL-SERNA, J., GONZÁLEZ-SALGADO, A., GONZÁLEZ-JAÉN, M.T., VÁZQUEZ, C. y PATIÑO, B. (2009). ITS-based detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* in grapes and green coffee beans by real-time quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology** 131, 162-167.
- GHIRETTI, G.P., SPOTTI, E., STRINA, F., MORI, G., ATTOLINI, G., LEONI, C. y SANDEI, L. (1995). Ergosterol production by different types of moulds able to colonize tomatoes. **Industria Conserve** 70, 3-12.
- GONZÁLEZ-SALGADO, A., GONZÁLEZ-JAÉN, T., VÁZQUEZ, C. y PATIÑO, B. (2008). Highly sensitive PCR-based detection method specific for *Aspergillus flavus* in wheat flour. **Food Additives and Contaminants** 25, 758-764.
- GONZÁLEZ-SALGADO, A., PATIÑO, B., GIL-SERNA, J., VÁZQUEZ, C. y GONZÁLEZ-JAÉN, M.T. (2009). Specific detection of *Aspergillus carbonarius* by SYBR® Green and TaqMan® quantitative PCR assays based on the multicopy ITS2 region of the rRNA gene. **FEMS Microbiology Letters** 295, 57-66.
- GOURAMA, H. y BULLERMAN, L.B. (1995). Detection of molds in foods and feeds: potential rapid and selective methods. **Journal of Food Protection** 58, 1389-1394.

- GRIFFIN, G.F. y CHU, F.S. (1983). Toxicity of the *Alternaria* metabolites alternariol, alternariol mono-methyl ether, altenuene and tenuazonic acid in the chicken embryo assay. **Applied and Environmental Microbiology** 46, 1420-1422.
- GROOT, S.P.C., VAN DER WOLF, J.M., JALINK, H., LANGERAK, C.J. y VAN DEN BULK, R.W. (2004). Challenges for the production of high quality organic seeds. **Seed Testing International** 127, 12-15.
- GUILLEMETTE, T., IACOMI, B. y SIMONEAU, P. (2004). Conventional and real-time PCR-based assay for detecting pathogenic *Alternaria brassicae* in cruciferous seed. **Plant Disease** 88, 490-496.
- GUTAROWSKA, B. y ZAKOWSKA, Z. (2009). Mathematical models of mycelium growth and ergosterol synthesis in stationary mould culture. **Letters in Applied Microbiology** 48, 605-610.
- GUTAROWSKA, B. y ZAKOWSKA, Z. (2010). Estimation of fungal contamination of various plant materials with UV-determination of fungal ergosterol. **Annals of Microbiology** 60, 415-422.
- HAGEDORN, D.J. e INGLIS, D.A. (1986). Handbook of Bean Diseases. University of Wisconsin-Madison Extension (Ed.), Estados Unidos.
- HÄGGBLUM, P., STEPINSKA, A. y SOLYAKOV, A. (2007). *Alternaria* mycotoxins in Swedish feed grain. En: Proceedings of the 29th mycotoxin workshop, 14-16 Mayo 2007. Gesellschaft für Mycotoxin Forschung (Ed.), Stuttgart-Fellbach, Alemania.
- HALFON-MEIRI, A. y RYLSKI, I. (1983). Internal mold caused in sweet pepper by *Alternaria alternata*: Fungal ingress. **Phytopathology** 73, 67-70.
- HAMELS, S., GLOUDEN, T., GILLARD, K., MAZZARA, M., DEBODE, F., FOTI, N., SNEYERS, M., NUEZ, T.E., PLA, M., BERBEN, G., MOENS, W., BERTHEAU, Y., AUDEON, C., VAN DEN EEDE, G. y REMACLE, J. (2009). A PCR-microarray method for the screening of genetically modified organisms. **European Food Research and Technology** 228, 531-541.
- HARIMOTO, Y., TANAKA, T., KODAMA, M., YAMAMOTO, M., OTANI, H. y TSUGE, T. (2008). Multiple copies of AMT2 are prerequisite for the apple pathotype of *Alternaria alternata* to produce enough AM-toxin for expressing pathogenicity. **Journal of General Plant Pathology** 74, 222-229.
- HARTMAN, G.L., SINCLAIR, J.B. y RUPE, J.C. (1999). Compendium of soybean diseases, 4ª ed. APS press (Ed.), St. Paul, Estados Unidos.
- HARVAN, D.J. y PERO, R.W. (1976). The structure and toxicity of the *Alternaria* metabolites. En: Advances in chemistry series 149: Mycotoxins and other fungal related food problems. Rodricks, J.V. (Ed.). Washington, Estados Unidos.
- HEREBIAN, D., ZÜHLKE, S., LAMSHÖFT, M. y SPITELLER, M. (2009). Multi-mycotoxin analysis in complex biological matrices using LC-ESI/MS: Experimental study using triple stage quadrupole and LTQOrbitrap. **Journal of Separation Science** 32, 939-948.
- HERMAN, L. (1997). Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. **Food Microbiology** 14, 103-110.
- HIERRO, N., ESTEVE-ZARZOSO, B., GONZÁLEZ, A., MAS, A. y GUILLAMÓN, J.M. (2006). Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. **Applied and Environmental Microbiology** 72, 7148-7155.
- HONG, S.G., CRAMER, R.A., LAWRENCE, C.B. y PRYOR, B.M. (2005). Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: Analysis of phylogenetic content and secondary structure. **Fungal Genetics and Biology** 42, 119-129.
- HONG, S., MACCARONI, M., FIGULI, P., PRYOR, B.M. y BELISARIO, A. (2006). Polyphasic classification of *Alternaria* isolated from hazelnut and walnut fruit in Europe. **Mycological Research** 110, 1290-1300.
- INSTITUTO FEDERAL DE EVALUACIÓN DE RIESGOS DE ALEMANIA (BfR). *Alternaria*-Toxine in Lebensmitteln 2003; 2.
- ISSHIKI, A., OHTANI, K., KYO, M., YAMAMOTO, H. y AKIMITSU, K. (2003). Green fluorescent detection of fungal colonization and endopolygalacturonase

- gene expression in the interaction of *Alternaria citri* with citrus. **Phytopathology** 93, 768-773.
- IZUMI, Y., KAMEI, E., MIYAMOTO, Y., OHTANI, K., MASUNAKA, A., FUKUMOTO, T., GOMI, K., TADA, Y., ICHIMURA, K., PEEVER, T.L. y AKIMITSU, K. (2012). Role of the pathotype-specific ACRTS1 gene encoding a hydroxylase involved in the biosynthesis of host-selective ACR-toxin in the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata*. **Phytopathology** 102, 741-748.
- JACKSON, L.S. y AL-TAHER, F. (2008). Factors affecting mycotoxin production in fruits. En: Mycotoxins in Fruits and Vegetables. Elsevier (Ed.), San Diego, Estados Unidos.
- JONES, A.L. y ALDWINCKLE, H.S. (2002). Plagas y enfermedades del manzano y del peral. The American Phytopathological Society (Ed.), Estados Unidos.
- JURADO, M., MARÍN, P., MAGÁN, N. y GONZÁLEZ-JAÉN, M.T. (2008). Relationship between solute and matrix potential stress, temperature, growth, and FUM1 gene expression in two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. **Applied and Environmental Microbiology** 74, 2032-2036.
- KADA, T., SADAIE, Y. y SAKAMOTO, Y. (1984). *Bacillus subtilis* repair test. En: Handbook of mutagenicity test procedures, 2ª ed. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. y Ramel, C. (Eds.). Amsterdam, Holanda.
- KAKVAN, N., ZAMANIZADEH, H., HAJMANSOOR, S., TAHERI, H. y MORID, B. (2009). Pathogenic and genetic diversity of *Alternaria alternata* isolates from Tangerine hybrids of Iran, based on RAPD-PCR technique. **Phytopathology** 99, S60.
- KALE, S.P., CARY, J.W., HOLLIS, N., WILKINSON, J.R., BHATNAGAR, D., YU, J., CLEVELAND, T.E. y BENNETT, J.W. (2007). Analysis of aflatoxin regulatory factors in serial transfer-induced non-aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. **Food Additives and Contaminants** 24, 1061-1069.
- KAROLEWIEZ, A. y GEISEN, R. (2005). Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxin polyketide synthase gene. **Systematic and Applied Microbiology** 28, 588-595.
- KASSIM, N., KIM, K., MTENGA, A.B., SONG, J.E., LIU, Q., SHIM, W.B. y CHUNG, D.H. (2011). A preliminary study of T-2 and HT-2 toxins in cereals sold in traditional market in South Korea. **Food Control** 22, 1408-1412.
- KELLER, N., TURNER, G. y BENNERR, J.W. (2005). Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. **Nature Reviews. Microbiology** 3, 937-947.
- KIM, J.Y., YEO, S., BAEK, S.Y. y CHOI, H.S. (2011). Molecular and morphological identification of fungal species isolated from Bealmijang Meju. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 21, 1270-1279.
- KLINGSPOR, L. y JALAL, S. (2006). Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. **Clinical Microbiology and Infection** 12, 745-753.
- KOCH, K., PODLECH, J., PFEIFFER, E. y METZLER, M. (2005). Total synthesis of alternariol. **The Journal of Organic Chemistry** 70, 3275-3276.
- KOHL, J., VLASWINKEL, M., GROENENBOOM-DE HAAS, B.H., KASTELEIN, P., VAN HOOFF, R.A., VAN DER WOLF, J.M. y KRIJGER, M. (2011). Survival of pathogens of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* Gemmifera Group) in crop residues. **Plant Pathology** 60, 661-670.
- KONKOL, N., MCNAMARA, C.J. y MITCHELL, R. (2010). Fluorometric detection and estimation of fungal biomass on cultural heritage materials. **Journal of Microbiological Methods** 80, 178-182.
- KONSTANTINOVA, P., BONANTS, P., VAN GENTPELZER, M., VAN DER ZOUWEN, P. y VAN DEN BULK, R. (2002). Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. **Mycological Research** 106, 23-33.
- KRALOVA, J., HAJŠLOVÁ, J., POUSTKA, J., HOCHMAN, M., BJELKOVÁ, M. y ODSTRČILOVÁ, L. (2006). Occurrence of *Alternaria* toxins in fibre flax, linseed, and peas grown in organic and conventional farms: monitoring pilot study. **Czech Journal of Food Sciences** 24, 288-296.

- KRISTENSEN, R., GAUTHIER, G., BERDAL, K.G., HAMELS, S., REMACLE, J. y HOLST-JENSEN, A. (2007). DNA microarray to detect and identify trichothecene- and moniliformin-producing *Fusarium* species. **Journal of Applied Microbiology** 102, 1060-1070.
- KULIK, T. (2008). Detection of *Fusarium tricinctum* from cereal grain using PCR assay. **Journal of Applied Genetics** 49, 305-311.
- KULIK, T., JESTOI, M. y OKORSKI, A. (2011). Development of TaqMan assays for the quantitative detection of *Fusarium avenaceum*/*Fusarium tricinctum* and *Fusarium poae* esyn1 genotypes from cereal grain. **FEMS Microbiology Letters** 314, 49-56.
- KUMAR, R., ANSARI, K.M., SAXENA, N., DWIVEDI, P.D., JAIN, S.K. y DAS, M. (2012). Detection of Ochratoxin A in wheat samples in different regions of India. **Food Control** 26, 63-67.
- KUMAR, V., HALDAR, S., PANDEY, K.K., SINGH, R.P., SINGH, A.K. y SINGH, P.C. (2008). Cultural, morphological, pathogenic and molecular variability amongst tomato isolates of *Alternaria solani* in India. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 24, 1003-1009.
- LAGOPODI, A.L. y THANASSOULOPOULOS, C.C. (1998). Effect of a leaf spot disease caused by *Alternaria alternata* on yield of sunflower in Greece. **Plant Disease** 82, 41-44.
- LATIN, R., RANE, K.K. y EVANS, K.J. (1994). Effect of *Alternaria* leaf blight on soluble solids content of muskmelon. **Plant Disease** 78, 979-982.
- LAU, B., SCOTT, P.M., LEWIS, D.A., KANHERE, S.R., CLEROUX, C. y ROSCOE, V. (2003). Liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in fruit juices and beverages. **Journal of Chromatography A** 998, 119-131.
- LEBRUN, M., DUTFOY, F., GAUDEMER, F., KUNESCH, G. y GAUDEMER, A. (1990). Detection and quantification of the fungal phytotoxin tenuazonic acid produced by *Pyricularia oryzae*. **Phytochemistry** 26, 3777-3783.
- LEHMANN, L., WAGNER, J. y METZLER, M. (2006). Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. **Food and Chemical Toxicology** 44, 398-408.
- LEIMINGER, J.H. y HAUSLADEN, H. (2012). Early blight control in potatoes using disease-orientated threshold values. **Plant Disease** 96, 124-130.
- LEZAR, S. y BARROS, E. (2010). Oligonucleotide microarray for the identification of potential mycotoxigenic fungi. **BMC Microbiology** 10, 87.
- LI, X.R., MA, E., YAN, L., MENG, H., DU, X., ZHANG, S. y QUAN, Z. (2011). Bacterial and fungal diversity in the traditional Chinese liquor fermentation process. **International Journal of Food Microbiology** 146, 31-37.
- LI, Y., SHEN, Y., ZHU, X. y DU, L. (2009). Introduction of the AAL-Toxin polyketide synthase gene ALT1 into FUM1-disrupted *Fusarium verticillioides* produces metabolites with the fumonisin methylation pattern. **Journal of Natural Products** 72, 1328-1330.
- LIN, T., FAN, M., WANG, S. y HUANG, J. (2011). Identification of the *Solanum nigrum* extract component involved in controlling cabbage black leaf spot disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 59, 1667-1672.
- LINCY, S.V., LATHA, R., CHANDRASHEKAR, A. y MANONMANI, H.K. (2008). Detection of toxigenic fungi and quantification of type A trichothecene levels in some food and feed materials from India. **Food Control** 19, 962-966.
- LIU, G., QIAN, Y., ZHANG, P., DONG, W., QI, Y. y GUO, H. (1992). Etiological role of *Alternaria alternata* in human oesophageal cancer. **Chinese Medical Journal** 105, 394-400.
- LIU, G., QIAN, Y., ZHANG, P., DONG, Z.M., SHI, Z.Y., ZHEN, Y.Z., MIAO, J. y XU, Y.M. (1991). Relationships between *Alternaria alternata* and oesophageal cancer. En: Relevance to human cancer of N-nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxins. O'Neill, I.K., Chen, J. y Bartsch, H. (Eds.). International Agency for Research on Cancer, Lyon, Francia.



- LIVAK, K.J., FLOOD, S.P.A., MARMEJO, J., GIUSTI, W. y DEETZ, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR products and nucleic acid hybridization. **PCR Methods and Applications** 4, 357-362.
- LLORENS, A., HINOJO, M.J., MATEO, R., GONZÁLEZ-JAÉN, M.T., VALLE-ALGARRA, F.M., LOGRIECO, A. y JIMÉNEZ, M. (2006). Characterization of *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). **International Journal of Food Microbiology** 106, 297-306.
- LOGRIECO, A., BOTTALICO, A., MULÉ, M., MORETTI, A. y PERRONE, G. (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. **European Journal of Plant Pathology** 109, 645-667.
- LOGRIECO, A., BOTTALICO, A., SOLFRIZZO, M. y MULÉ, G. (1990). Incidence of *Alternaria* species in grains from Mediterranean countries and their ability to produce mycotoxins. **Mycologia** 82, 501-505.
- LOGRIECO, A., MORETTI, A. y SOLFRIZZO, M. (2009). *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. **World Mycotoxin Journal** 2, 129-140.
- LÓPEZ-ERRASQUÍN, E., VÁZQUEZ, C., JIMÉNEZ, M. y GONZÁLEZ-JAÉN, M.T. (2007). Real-time RT-PCR assay to quantify the expression of *fum1* and *fum19* genes from the Fumonisin-producing *Fusarium verticillioides*. **Journal of Microbiological Methods** 68, 312-317.
- LOURENÇO, V., RODRIGUES, T., CAMPOS, A., BRAGANÇA, C., SCHEUERMANN, K.K., REIS, A., BROMMONSCHENKEL, S.H., MAFFIA, L.A. y MIZUBUTI, E. (2011). Genetic structure of the population of *Alternaria solani* in Brazil. **Journal of Phytopathology** 159, 233-240.
- LOZYNSKA, I., VAN DRIEL, L. y ERRAMPALLI, D. (2010). Classification of *Penicillium* spp. in apples collected from packinghouses in southern Ontario using PCR-RFLP. **Canadian Journal of Plant Pathology** 32, 426-427.
- LU, X., HOLLOWAY, B., DARE, R.K., KUYPERS, J., YAGI, S., WILLIAMS, J.V., HALL, C.B. y ERDMAN, D.D. (2008). Real-time reverse transcription-PCR assay for comprehensive detection of human rhinoviruses. **Journal of Clinical Microbiology** 46, 533-539.
- LUQUE, M.I., RODRÍGUEZ, A., ANDRADE, M.J., GORDILLO, R., RODRÍGUEZ, M. y CÓRDOBA, J.J. (2011). Development of a PCR protocol to detect patulin producing moulds in food products. **Food Control** 22, 1831-1838.
- LUQUE, M.I., RODRÍGUEZ, A., ANDRADE, M.J., MARTÍN, A. y CÓRDOBA, J.J. (2012). Development of a PCR protocol to detect aflatoxigenic molds in food products. **Journal of Food Protection** 75, 85-94.
- LUND, M. y MADSEN, M. (2006). Strategies for the inclusion of an internal amplification control in conventional and real time PCR detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples. **Molecular and Cellular Probes** 20, 92-99.
- LUO, Y., GAO, W., DOSTER, M. y MICHAILIDES, T.J. (2009). Quantification of conidial density of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in soil from almond orchards using real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology** 106, 1649-1660.
- LUO, Y., MA, Z., REYES, H.C., MORGAN, D.P. y MICHAILIDES, T.J. (2007). Using real-time PCR to survey frequency of azoxystrobin-resistant allele G143A in *Alternaria* populations from almond and pistachio orchards in California. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 88, 328-336.
- MAAS, J.L. (1998). Compendium of strawberry diseases, 2ª ed. APS press (Ed.), St. Paul, Estados Unidos.
- MAGAN, N. (1993). Early detection of fungi in stored grain. **International Biodeterioration and Biodegradation** 32, 145-160.
- MAGAN, N. y BAXTER, E.S. (1994). Environmental factors and tenuazonic acid production by *Alternaria* spp., isolated from sorghum. En: Stored Product Protection. Highley, E., Wright, E.J., Banks, H.J. y Champ, B.R. (Eds.). Wallingford, Estados Unidos.

- MAGAN, N. y LACEY, J. (1984). Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and wheat grain. **Applied and Environmental Microbiology** 47, 1113-1117.
- MAGNANI, R.F., DE SOUZA, G.D. y RODRIGUES-FILHO, E. (2007). Analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether on flavedo and albedo tissues of tangerines (*Citrus reticulata*) with symptoms of *Alternaria* brown spot. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 55, 4980-4986.
- MAGNOLI, C., ASTORECA, A., PONSONE, M.L., FERNÁNDEZ-JURI, M.G., BARBERIS, C. y DALCERO, A.M. (2007). Ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in peanut seeds at different months of storage in Córdoba, Argentina. **International Journal of Food Microbiology** 119, 213-218.
- MANSFIELD, M.A., ARCHIBALD, D.D., JONES, A.D. y KULDAU, G.A. (2007). Relationship of sphinganine analog mycotoxin contamination in maize silage of seasonal weather conditions and to agronomic and ensiling practices. **Phytopathology** 97, 504-511.
- MARÍN, P., JURADO, M., MAGÁN, N., VÁZQUEZ, C. y GONZÁLEZ-JAÉN, M.T. (2010). Effect of solute stress and temperature on growth rate and TRI5 gene expression using real time RT-PCR in *Fusarium graminearum* from Spanish wheat. **International Journal of Food Microbiology** 140, 169-174.
- MARÍN, S., RAMOS, A.J. y SANCHÍS, V. (2005). Comparison of methods for the assessment of growth of food spoilage moulds in solid substrates. **International Journal of Food Microbiology** 99, 329-341.
- MARKO, D. (2007). Mechanisms of the genotoxic effect of *Alternaria* toxins. En: Proceedings of the 29th mycotoxin workshop, 14-16 Mayo 2007. Gesellschaft für Mycotoxin Forschung (Ed.), Stuttgart-Fellbach, Alemania.
- MARTÍN, I., GARCÍA, T., FAJARDO, V., ROJAS, M., PEGELS, N., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2009). SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feed-stuffs. **Meat Science** 82, 252-259.
- MARTÍNEZ, J., GUTIERREZ, A., POSTIGO, I., CARDONA, G. y GUISANTES, J. (2006). Variability of Alt a 1 expression by different strains of *Alternaria alternata*. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology** 16, 279-282.
- MATEU-PUCHADES, A., MARQUINA-VILA, A., FERRANDO-ROCA, F. y NEUS, M. (2010). Cutaneous alternariosis in renal transplant recipient. **Journal of the American Academy of Dermatology** 62, AB86.
- MATYSIK, G. y GIRYN, H. (1996). Gradient thin-layer chromatography and densitometry determination of *Alternaria* mycotoxins. **Chromatographia** 42, 555-558.
- MAYORAL, M.B., MARTÍN, R., HERNÁNDEZ, P.E., GONZÁLEZ, I. y GARCÍA, T. (2006). A reverse transcriptase PCR technique for the detection and viability assessment of *Kluyveromyces marxianus* in yoghurt. **Journal of Food Protection** 69, 2210-2216.
- MCCORMICK, S.P., ALEXANDER, N.J. y PROCTOR, R.H. (2006). *Fusarium Tri4* encodes a multifunctional oxygenase required for trichothecene biosynthesis. **Canadian Journal of Microbiology** 52, 636-642.
- MIDORIKAWA, G., PINHEIRO, M., VIDIGAL, B.S., ARRUDA, M.C., COSTA, F.F., PAPPAS JR, G.J., RIBEIRO, S.G., FREIRE, F. y MILLER, R. (2008). Characterization of *Aspergillus flavus* strains from Brazilian Brazil nuts and cashew by RAPD and ribosomal DNA analysis. **Letters in Applied Microbiology** 47, 12-18.
- MIYAMOTO, Y., ISHII, Y., HONDA, A., MASUNAKA, A., TSUGE, T., YAMAMOTO, M., OHTANI, K., FUKUMOTO, T., GOMI, K., PEEVER, T.L. y AKIMITSU, K. (2009). Function of genes encoding acyl-CoA synthetase and enoyl-CoA hydratase for host-selective ACT-toxin biosynthesis in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. **Phytopathology** 99, 369-377.
- MONBALIU, S., VAN POUCKE, C., DETAVERNIER, C., DUMOULIN, F., VAN DE VELDE, M., SCHOETERS, E., VAN DYCK, S., AVERKIEVA, O., VAN PETEGHEM, C. y DE SAEGER, S. (2010). Occurrence of mycotoxins in feed as ana-

- lyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. **Journal of Agricultural Food Chemistry** 58, 66-71.
- MONBALIU, S., VAN POUCKE, C., VAN PETEGHEM, C., VAN POUCKE, K., HEUNGENS, K. y DE SAEGER, S. (2009). Development of a multi-mycotoxin liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for sweet pepper analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** 23, 3-11.
- MONTEMURRO, N. y VISCONTI, A. (1992). *Alternaria* metabolites – Chemical and biological data. En: *Alternaria: biology, plant diseases and metabolites*. Chelkowski, J. y Visconti, A. (Eds.). Amsterdam, Holanda.
- MORETTI, A., FERRACANE, L., SOMMA, S., RICCI, V., MULÉ, G., SUSCA, A., RITIENI, A. y LOGRIECO, A. (2010). Identification, mycotoxin risk and pathogenicity of *Fusarium* species associated with fig endosepsis in Apulia, Italy. **Food Additives and Contaminants** 27, 718-728.
- MORRIS, P.F., CONNOLLY, M.S. y ST CLAIR, D.A. (2000). Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. **Mycological Research** 104, 286-292.
- MOSLEM, M.A., MASHRAQI, A., ABD-ELSALAM, K.A., BAHKALI, A.H. y ELNAGAER, M.A. (2010). Molecular detection of ochratoxigenic *Aspergillus* species isolated from coffee beans in Saudi Arabia. **Genetics and Molecular Research** 9, 2292-2299.
- MOUSSES, S., KALLIONIEMI, A., KAURANIEMI, P., ELKAHLOUN, A. y KALLIONIEMI, O.P. (2002). Clinical and functional target validation using tissue and cell microarrays. **Current Opinion in Chemical Biology** 6, 97-101.
- MULÉ, G., SUSCA, A., LOGRIECO, A., STEA, G. y VISCONTI, A. (2006). Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. **International Journal of Food Microbiology** 111, S28-S34.
- MURRAY, T., PARRY, D. y CATTLIN, N. (2008). A colour handbook of diseases of small grain cereal crops. Manson Publishing (Ed.), Londres, Reino Unido.
- NAWAZ, S., SCUDAMORE, K.A. y RAINBIRD, S.C. (1997). Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: I. Determination of *Alternaria* mycotoxins in oilseed rape meal and sunflower seed meal. **Food Additives and Contaminants** 14, 249-262.
- NDUBE, N., VAN DER WESTHUIZEN, L. y SHEPHARD, G.S. (2009). Determination of fumonisins in maize by HPLC with ultraviolet detection of o-phthaldialdehyde derivatives. **Mycotoxin Research** 25, 225-228.
- NIEM, J., MIYARA, I., ETTEGGUI, Y., REUVENI, M., FLAISHMAN, M. y PRUSKY, D. (2007). Core rot development in red delicious apples is affected by susceptibility of the seed locule to *Alternaria alternata* colonization. **Phytopathology** 97, 1415-1421.
- NIESSEN, L. (2007). PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology** 119, 38-46.
- NOSER, J., SCHNEIDER, P., ROTHER, M. y SCHMUTZ, H. (2011). Determination of six *Alternaria* toxins with UPLC-MS/MS and their occurrence in tomatoes and tomato products from the Swiss market. **Mycotoxin Research** 27, 265-271.
- NUEZ, F., GIL, R. y COSTA, J. (2003). El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Mundi-Prensa (Ed.), Madrid, España.
- NUNEZ, F., WESTPHAL, C.D., BERMUDEZ, E. y ASENSIO, M.A. (2007). Production of secondary metabolites by some terverticillate penicillia on carbohydrate-rich and meat substrates. **Journal of Food Protection** 70, 2829-2836.
- O'CALLAGHAN, J., STAPLETON, P.C. y DOBSON, A.D.W. (2006). Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. **Fungal Genetics and Biology** 43, 213-221.
- OGAWA, J.M., ZEHR, E.I., BIRD, G.W., RITCHIE, D.F., URIU, K. y UYEMOTO, J.K. (1995). Compendium of stone fruit diseases. APS press (Ed.), St. Paul, Estados Unidos.
- OSBORNE, L.C., JONES, V.I., PEELER, J.T. y LARKIN, E.P. (1988). Transformation of C3H/10T½ cells and induction of EBV-early antigen in Raji

- cells by altertoxins I and III. **Toxicology In Vitro** 2, 97-102.
- OSTRY, V. (2008). *Alternaria* mycotoxins: An overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. **World Mycotoxin Journal** 1, 175-188.
- OSTRY, V., SKARKOVA, J. y RUPRICH, J. (2004). Occurrence of *Alternaria* mycotoxins and *Alternaria* spp. En: Lentils and human health, 26. Abstract of the Mycotoxin-Workshop, Herrsching, Alemania.
- OVIEDO, M.S., RAMIREZ, M.L., BARROS, G.G. y CHULZE, S.N. (2011). Influence of water activity and temperature on growth and mycotoxin production by *Alternaria alternata* on irradiated soya beans. **International Journal of Food Microbiology** 149, 127-132.
- PANIGRAHI, S. y DALLIN, S. (1994). Toxicity of the *Alternaria* spp metabolites, tenuazonic acid, alternariol, altertoxin-I, and alternariol monomethyl ether to brine shrimp - (*Artemia salina* L) larvae. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 66, 493-496.
- PARK, M.S., ROMANOSKI, C.E. y PRYOR, B.M. (2008). A re-examination of the phylogenetic relationship between the causal agents of carrot black rot, *Alternaria radicina* and *A. carotiincultae*. **Mycologia** 100, 511-527.
- PASQUALI, M., GIRAUD, F., BROCHOT, C., COCCO, E., HOFFMANN, L. y BOHN, T. (2010). Genetic *Fusarium* chemotyping as a useful tool for predicting nivalenol contamination in winter wheat. **International Journal of Food Microbiology** 137, 246-253.
- PASSONE, M.A., ROSSO, L.C., CIANCIO, A. y ETCHEVERRY, M. (2010). Detection and quantification of *Aspergillus* section *Flavi* spp. in stored peanuts by real-time PCR of nor-1 gene, and effects of storage conditions on aflatoxin production. **International Journal of Food Microbiology** 138, 276-281.
- PASTOR, F.J. y GUARRO, J. (2008). *Alternaria* infections: laboratory diagnosis and relevant clinical features. **Clinical Microbiology and Infection** 14, 734-746.
- PATEL, S.J., SUBRAMANIAN, R.B. y JHA, Y.S. (2011). Biochemical and molecular studies of early blight disease in tomato. **Phytoparasitica** 39, 269-283.
- PATRIARCA, A., AZCARATE, M.P., TERMINIELLO, L. y FERNÁNDEZ, V. (2007). Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinean wheat. **International Journal of Food Microbiology** 119, 219-222.
- PAVÓN, M.A., GONZÁLEZ, I., LUNA, A., MARTÍN, R. y GARCÍA, T. (2012a). PCR-based assay for the detection of *Alternaria* species and correlation with HPLC determination of alternene, alternariol and alternariol monomethyl ether production in tomato products. **Food Control** 25, 45-52.
- PAVÓN, M.A., GONZÁLEZ, I., MARTÍN, R. Y GARCÍA, T. (2012b). ITS-based detection and quantification of *Alternaria* spp. in raw and processed vegetables by real-time quantitative PCR. **Food Microbiology** 32, 165-171.
- PAVÓN, M.A., GONZÁLEZ, I., PEGELS, N., MARTÍN, R. y GARCÍA, T. (2010). PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a 1. **Food Control** 21, 1745-1756.
- PAVÓN, M.A., GONZÁLEZ, I., ROJAS, M., PEGELS, N., MARTÍN, R. y GARCÍA, T. (2011). PCR detection of *Alternaria* spp. in processed foods, based on the internal transcribed spacer genetic marker. **Journal of Food Protection** 74, 240-247.
- PEARSON, R.C. y GOHEEN, A.C. (1988). Compendium of grape diseases. APS press (Ed.), St. Paul, Estados Unidos.
- PEARSON, R.C. y HALL, D.H. (1975). Factors affecting the occurrence and severity of blackmold of ripe tomato fruit caused by *Alternaria alternata*. **Phytopathology** 65, 1352-1359.
- PEEVER, T.L., CARPENTER-BOGGS, L., TIMMER, L.W., CARRIS, L.M. y BHATIA, A. (2005). Citrus black rot is caused by phylogenetically distinct lineages of *Alternaria alternata*. **Phytopathology** 95, 512-518.
- PEEVER, T.L., IBANEZ, A., AKIMITSU, K. y TIMMER, L.W. (2002). Worldwide phylogeography of the cit-

- rus brown spot pathogen, *Alternaria alternata*. **Phytopathology** 92, 794-802.
- PERELLÓ, A., MORENO, M. y SISTERNA, M. (2008). *Alternaria infectoria* species-group associated with black point of wheat in Argentina. **Plant Pathology** 57, 379.
- PERELLÓ, A. y SISTERNA, M. (2006). Leaf blight of wheat caused by *Alternaria trititica* in Argentina. **Plant Pathology** 55, 303.
- PERO, R.W., POSNER, H., BLOIS, M., HARVAN, D. y SPALDING, J.W. (1973). Toxicity of metabolites produced by the '*Alternaria*'. **Environmental Health Perspectives** 4, 87-94.
- PERRONE, G., SUSCA, A., EPIFANI, F. y MULÉ, G. (2006). AFLP characterization of southern Europe population of *Aspergillus* section *Nigri* from grapes. **International Journal of Food Microbiology** 111, S22-S27.
- PETER, C., BRÜNEN-NEWELE, C., KAMMANN, K., y BÖRCHERS, T. (2004). Differentiation of animal species in food by oligonucleotide microarray hybridization. **European Food Research and Technology** 219, 183-293.
- PFEIFFER, E., ESCHBACH, S. y METZLER, M. (2007). *Alternaria* toxins: DNA strand-breaking activity in mammalian cells *in vitro*. **Mycotoxin Research** 23, 152-157.
- PHUWAPRAISIRISAN, P., RANGSAN, J., SIRIPONG, P. y TIP-PYANG, S. (2009). New antitumour fungal metabolites from *Alternaria porri*. **Natural Product Research** 23, 1063-1071.
- PITT, J.I. y HOCKING, A.D. (1997). Fungi and food spoilage. Blackie Academic and Professional (Ed.), Londres, Reino Unido.
- PLOETZ, R.C., ZENTMYER, G.A., NISHIJIM, W.T., ROHRBACH, K.G. y OHR, H.D. (1994). Compendium of tropical fruit diseases. APS press (Ed.), St. Paul, Estados Unidos.
- POLISENSKA, I., PFOHL-LESZKOWICZ, A., HADJEBA, K., DOHNAL, V., JIRSA, O., DENESOVA, O., JEZKOVA, A. y MACHARACKOVA, P. (2010). Occurrence of ochratoxin A and citrinin in Czech cereals and comparison of two HPLC methods for ochratoxin A detection. **Food Additives and Contaminants** 27, 1545-1557.
- POLIZZOTTO, R., ANDERSEN, B., MARTINI, M., GRISAN, S., ASSANTE, G. y MUSETTI, R. (2012). A polyphasic approach for the characterization of endophytic *Alternaria* strains isolated from grapevines. **Journal of Microbiological Methods** 88, 162-171.
- POSE, G., LUDEMANN, V., SEGURA, J. y FERNÁNDEZ, V. (2004). Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from tomatoes affected by blackmold in Argentina. **Mycotoxin Research** 20, 80-86.
- POSE, G., PATRIARCA, A., KYANKO, V., PARDO, A. y FERNÁNDEZ, V. (2010). Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. **International Journal of Food Microbiology** 142, 348-353.
- POTTS, S.J., SLAUGHTER, D.C. y THOMPSON, J.F. (2000). A fluorescent lectin test for mold in raw tomato juice. **Journal of Food Science** 65, 346-350.
- PRASAD, M.S.L., SUJATHA, M. y RAO, S.C. (2009). Analysis of cultural and genetic diversity in *Alternaria helianthi* and determination of pathogenic variability using wild helianthus species. **Journal of Phytopathology** 157, 609-617.
- PRINS, T.W., VAN DIJK, J.P., VAN HOEF, A.M.A., VOORHUIJZEN, M.M., BROEDERS, S., TRAPMANN, S., SEYFARTH, R., PARDIGOL, A., SCHOEN, C.D., AARTS, H.J.M. y KOK, E.J. (2010). Towards a multiplex cereal traceability tool using padlock probe ligation on genomic DNA. **Food Chemistry** 118, 966-973.
- PROCTOR, R.H., DESJARDINS, A.E., PLATTNER, R.D. y HONH, T.M. (1999). A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. **Fungal Genetics and Biology** 27, 100-112.
- PRYOR, B. y GILBERTSON, R.L. (2000). Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. **Mycological Research** 104, 1312-1321.

- PRYOR, B. y GILBERTSON, R.L. (2001). A PCR-based assay for detection of *Alternaria radicina* on carrot seed. **Plant Disease** 85, 18-23.
- PRYOR, B y GILBERTSON, R.L. (2002). Relationships and taxonomic status of *Alternaria radicina*, *A. carotiincultae*, and *A. petroselini* based upon morphological, biochemical, and molecular characteristics. **Mycologia** 94, 49-61.
- PRYOR, B.M. y MICHAILIDES, T.J. (2002). Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. **Phytopathology** 92, 406-416.
- QUEIROZ, F.M., MUNIZ, M. y MENEZES, M. (2000). *Alternaria brasiliensis* sp. nov., a leaf pathogen on *Phaseolus vulgaris*. **Mycopathologia** 150, 61-65.
- RAJA, P., REDDY, A.V.R. y ALLAM, U.S. (2006). First report of *Alternaria tenuissima* causing leaf spot and fruit rot on eggplant (*Solanum melongena*) in India. **Plant Pathology** 55, 579.
- RAMANA, M.V., BALAKRISHNA, K., MURALI, H. y BATRA, H.V. (2011). Multiplex PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in rice and finger millet collected from southern India. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 91, 1666-1673.
- RANTSIOU, K., ALESSANDRIA, V., URSO, R., DOLCI, P. Y COCOLIN, L. (2008). Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology** 121, 99-105.
- RASMUSSEN, R.R., STORM, I.M.L.D., RASMUSSEN, P.H., SMEDSGAARD, J. y NIELSEN, K.F. (2010). Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 397, 765-776.
- REGNER, S., SCHNUERER, J. y JONSSON, A. (1994). Ergosterol content in relation to grain kernel weight. **Cereal Chemistry** 71, 55-58.
- REIS, A. y BOITEUX, L.S. (2010). *Alternaria* species infecting *Brassicaceae* in the Brazilian neotropics: geographical distribution, host range and specificity. **Journal of Plant Pathology** 92, 661-668.
- RIMMER, S.R., SHATTUCK, V.I. y BUCHWALDT, L. (2007). Compendium of brassica diseases. APS press (Ed.), St. Paul, Estados Unidos.
- ROBERTS, R.G., REYMOND, S.T. y ANDERSEN, B. (2000). RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. **Mycological Research** 104, 151-160.
- ROBIGLIO, A.L. y LÓPEZ, S.E. (1995). Mycotoxin production by *Alternaria alternata* strains isolated from Red Delicious apples in Argentina. **International Journal of Food Microbiology** 24, 413-417.
- RODRÍGUEZ, A., LUQUE, M.I., ANDRADE, M.J., RODRÍGUEZ, M., ASENSIO, M.A. y CÓRDOBA, J.J. (2011). Development of real-time PCR methods to quantify patulin-producing molds in food products. **Food Microbiology** 28, 1190-1199.
- RODRÍGUEZ, A., RODRÍGUEZ, M., LUQUE, M.I., JUSTESEN, A.F. y CÓRDOBA, J.J. (2012). A comparative study of DNA extraction methods to be used in real-time PCR based quantification of ochratoxin A-producing molds in food products. **Food Control** 25, 666-672.
- ROGERS, P.M. y STEVENSON, W.R. (2007). Intraspecific variation among isolates of *Alternaria dauci* collected from commercial carrots using genotypic and phenotypic markers. **Phytopathology** 97, S100.
- ROHACIK, T. y HUDEC, K. (2007). Fungal infection of malt barley kernels in Slovak Republic. **Plant Protection Science** 43, 86-93.
- ROLLEMBERG, C.L., FAYAD, F., HAMADA, N.A. y MAY DE MIO, L.L. (2011). First report of *Alternaria mali* on apples in Brazil. **Phytopathology** 101, S155-S156.
- ROMANO, C., VALENTI, L., MIRACCO, C., ALESSANDRINI, C., PACCAGNINI, E., FAGGI, E. y DIFONZO, E.M. (1997). Two cases of cutaneous phaeohyphomycosis by *Alternaria alternata* and *Alternaria tenuissima*. **Mycopathologia** 137, 65-74.
- RØNNING, S.B, RUDI, K., BERDAL, K.G. y HOLST-JENSEN, A. (2005). Differentiation of important and closely related cereal plant species (*Poaceae*)

- in food by hybridisation to an oligonucleotide array. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53, 8874-8880.
- ROTHROCK, C.S. y KIRKPATRICK, T.L. (2001). Compendium of cotton diseases, 2ª ed. APS press (Ed.), St. Paul, Estados Unidos.
- ROUSSEL, S., REBOUX, G., BELLANGER, A., SORNIN, S., GRENOUILLET, F., DALPHIN, J., PIARROUX, R. y MILLON, L. (2008). Characteristics of dwellings contaminated by moulds. **Journal of Environmental Monitoring** 10, 724-729.
- RUSSELL, R. y PATERSON, M. (2006). Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. **Process Biochemistry** 41, 1467-1474.
- RUSWANDI, S., KITANI, K., AKIMITSU, K., TSUGE, T., SHIRAISHI, T. y YAMAMOTO, M. (2005). Structural analysis of cosmid clone pcAFT-2 carrying AFT10-1 encoding an acyl-CoA dehydrogenase involved in AF-toxin production in the strawberry pathotype of *Alternaria alternata*. **Journal of General Plant Pathology** 71, 107-116.
- SAHA, D., FETZNER, R., BURKHARDT, B., PODLECH, J., METZLER, M., DANG, H., LAWRENCE, D. y FISCHER, R. (2012). Identification of a polyketide synthase required for alternariol (AOH) and alternariol-9-methyl ether (AME) formation in *Alternaria alternata*. **PLoS One** 7, e40564.
- SAMPIETRO, D.A., MARÍN, P., IGLESIAS, J., PRESELLO, D.A., VATTUONE, M.A., CATALAN, C. y GONZÁLEZ-JAÉN, M.T. (2010). A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. **Fungal Biology** 114, 74-81.
- SAMSON, R.A. y FRISVAD, J.C. (2004). *Penicillium* subgenus. *Penicillium* new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. Studies and Mycology, 49. CBS Fungal Biodiversity Centre (Ed.), Utrecht, Holanda.
- SAMSON, R.A., HOEKSTRA, E.S. y FRISVAD, J.C. (2004). Introduction to food-and airborne fungi. 7ª ed. CBS Fungal Biodiversity Centre (Ed.), Utrecht, Holanda.
- SÁNCHEZ, H. y BUSH, R.K. (2001). A review of *Alternaria alternata* sensitivity. **Revista Iberoamericana de Micología** 18, 56-59.
- SÁNCHEZ, B., RODRÍGUEZ, M., CASADO, E.M., MARTÍN, A. y CÓRDOBA, J.J. (2008). Development of an efficient fungal DNA extraction method to be used in random amplified polymorphic DNA-PCR analysis to differentiate cyclopiazonic acid mold producers. **Journal of Food Protection** 71, 2497-2503.
- SANTHA, M., SUJATHA, M. y CHANDER, S. (2009). Analysis of cultural and genetic diversity in *Alternaria helianthi* and determination of pathogenic variability using wild *Helianthus* species. **Journal of Phytopathology** 157, 609-617.
- SARDIÑAS, N., VÁZQUEZ, C., GIL-SERNA, J., GONZÁLEZ-JAÉN, M.T. y PATIÑO, B. (2011). Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR® Green quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology** 145, 121-125.
- SARLIN, T., YLI-MATTILA, T., JESTOI, M., RIZZO, A., PAAVANEN-HUHTALA, S. y HAIKARA, A. (2006). Real-time PCR for quantification of toxigenic *Fusarium* species in barley and malt. **European Journal of Plant Pathology** 114, 371-380.
- SAUER, D.B., SEITZ, L.M., BURROUGHS, R., MOHR, H.E., WEST, J.L., MILLERET, R.J. y ANTHONY, H.D. (1978). Toxicity of *Alternaria* metabolites found in weathered sorghum grain at harvest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 26, 1380-1383.
- SAUTER, G., SIMON, R. y HILLAN, K. (2003). Tissue microarrays in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery** 2, 962-972.
- SCHERF, U., ROSS, D.T., WALTHAM, M., SMITH, L.H., LEE, J.K., TANABE, L., KOHN, K.W., REINHOLD, W.C., MYERS, T.G., ANDREWS, D.T., SCUDIERO, D.A., EISEN, M.B., SAUSVILLE, E.A., POMMIER, Y., BOTSTEIN, D., BROWN, P.O. y WEINSTEIN, J.N. (2000). A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. **Nature Genetics** 24, 234-244.
- SCHERM, B., PALOMBA, M., SERRA, D., MARCELLO, A. y MIGHELI, Q. (2005). Detection of transcripts



- of the aflatoxin genes aflD, aflO, and aflP by reverse transcription–polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and non-producing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **International Journal of Food Microbiology** 98, 201-210.
- SCHMECHEL, D., GREEN, B.J., BLACHER, F.M., JANOTKA, E. y BEEZHOLD, D.H. (2008). The importance of antibody cross-reactivity for the development of environmental immunoassays for *Alternaria alternata*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 121, 763-768.
- SCHMIDT-HEYDT, M. y GEISEN, R. (2007). A microarray for monitoring the production of mycotoxins in food. **International Journal of Food Microbiology** 117, 131-140.
- SCHMIDT-HEYDT, M., RICHTER, W., MICHULEC, M., BUTTINGER, G. y GEISEN, R. (2008). Comprehensive molecular system to study the presence, growth and ochratoxin A biosynthesis of *Penicillium verrucosum* in wheat. **Food Additives and Contaminants** 25, 989-996.
- SCHOLLENBERGER, M., MÜLLER, H.M., RÜFLE, M., TERRY-JARA, H., SUCHY, S., PLANK, S. y DROCHNER, W. (2007). Natural occurrence of *Fusarium* toxins in soy food marketed in Germany. **International Journal of Food Microbiology** 113, 142-146.
- SCHRADER, T.J., CHERRY, W., SOPER, K. y LANGLOIS, I. (2006). Further examination of the effects of nitrosylation on *Alternaria alternata* mycotoxin mutagenicity *in vitro*. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis** 606, 61-71.
- SCHRADER, T.J., CHERRY, W., SOPER, K., LANGLOIS, I. y VIJAY, H.M. (2001). Examination of *Alternaria alternata* mutagenicity and effects of nitrosylation using the Ames *Salmonella* test. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis** 21, 261-274.
- SCHWARTZ, H.F. y MOHAN, S.K. (2008). Compendium of onion and garlic diseases and pests, 2ª ed. APS press (Ed.), St. Paul, Estados Unidos.
- SCHWARZ, C., KREUTZER, M. y MARKO, D. (2012). Minor contribution of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid to the genotoxic properties of extracts from *Alternaria alternata* infested rice. **Toxicology Letters** 214, 46-52.
- SCOTT, P.M. y KANHERE, S.R. (1980). Liquid chromatographic determination of tenuazonic acids in tomato paste. **Journal of AOAC International** 63, 3.
- SCOTT, P.M., LAWRENCE, G.A. y LAU, B.P.Y. (2006). Analysis of wines, grape juices and cranberry juices for *Alternaria* toxins. **Mycotoxin Research** 22, 142-147.
- SCOTT, P.M. y STOLTZ, D.R. (1980). Mutagens produced by *Alternaria alternata*. **Mutation Research** 78, 33-40.
- SCOTT, P.M., WEBER, D.A. y KANHERE, S.R. (1997). Gas chromatography-mass spectrometry of *Alternaria* mycotoxins. **Journal of Chromatography A** 765, 255-263.
- SERDANI, M., CROUS, P.W. y HOLZ, G. (1997). Endophytic fungi associated with core rot of apple, with specific reference to *Alternaria* spp. **Phytopathology** 87, S88.
- SEITZ, L.M., MOHR, H.E., BURROUGHS, R. y SAUER, D.B. (1977). Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. **Cereal Chemistry** 54, 1207-1217.
- SELMA, M.V., MARTÍNEZ-CULEBRAS, P.V. y AZNAR, R. (2008). Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. **International Journal of Food Microbiology** 122, 126-134.
- SEVILLA, R.G., DIEZ, A., NORÉN, M., MOUCHEL, O., JÉRÔME, M., VERREZ-BAGNIS, V., VAN PELT, H., FAVRE-KREY, L., KREY, G. y BAUTISTA, J.M. (2007). Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. **Molecular Ecology Notes** 7, 730-734.
- SHARMA, T.R. y TEWARI, J.P. (1998). RAPD analysis of three *Alternaria* species pathogenic to crucifers. **Mycological Research** 102, 807-814.
- SHEIJOONI-FUMANI, N., HASSAN, J. y YOUSEFI, S.R. (2011). Determination of aflatoxin B1 in cereals by homogeneous liquid-liquid extraction coupled to high performance liquid chromatography-

- fluorescence detection. **Journal of Separation Science** 34, 1333-1337.
- SHENDURE, J.A., PORRECA, G.J., CHURCH, G.M., GARDNER, A.F., HENDRICKSON, C.L., KIELECZAWA, J. y SLATKO, B.E. (2011). Overview of DNA sequencing strategies. **Current Protocols in Molecular Biology**, 7.1.
- SHERF, A.F. y MACNAB, A.A. (1986). Vegetable diseases and their control. John Wiley & Sons (Ed.), Nueva York, Estados Unidos.
- SHERIDAN, G.E.C., MASTERS, C.I., SHALLCROSS, J.A. y MACKEY, B.M. (1998). Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. **Applied and Environmental Microbiology** 64, 1313-1318.
- SIEGEL, D., MERKEL, S., KOCH, M. y NEHLS, I. (2010). Quantification of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in beer. **Food Chemistry** 120, 902-906.
- SIEGEL, D., RASENKO, T., KOCH, M. y NEHLS, I. (2009). Determination of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in cereals by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization ion-trap multistage mass spectrometry after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine. **Journal of Chromatography A** 1216, 4582-4588.
- SIMMONS, E.G. (2007). *Alternaria*. An identification manual. CBS Fungal Biodiversity Centre (Ed.), Utrecht, Holanda.
- SKARKOVA, J., OSTRY, V. y PROCHAZKOVA, I. (2005). Planar chromatographic determination of *Alternaria* toxins in selected foodstuffs. Proceedings of the International Symposium on Planar Separations, Planar Chromatography, Milestones in Instrumental TLC, 29-31 Mayo, Siofok, Hungría.
- SNOWDON, A.L. (1990). A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Vol I: General introduction and fruits. Wolfe Scientific Ltd. (Ed.), Londres, Reino Unido.
- SOLFRIZZO, M., DE GIROLAMO, A., VITTI, C., TYLKOWSKA, K., GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J., SZOPINSKA, D. y DORNA, H. (2005). Toxicogenic profile of *Alternaria alternata* and *Alternaria radicina* occurring on umbelliferous plants. **Food Additives and Contaminants** 22, 302-308.
- SOLFRIZZO, M., DE GIROLAMO, A., VITTI, C., VISCONTI, A. y VAN DEN BULK, R. (2004). Liquid chromatographic determination of *Alternaria* toxins in carrot. **Journal of AOAC International** 87, 101-106.
- SOLHAUG, A., VINES, L.L., IVANOVA, L., SPILSBERG, B., HOLME, J.A., PESTKA, J., COLLINS, A. y ERIKSEN, G.S. (2012). Mechanisms involved in alternariol-induced cell cycle arrest. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2012.09.001.
- SOMASHEKAR, D., RATI, E.R. y CHANDRASHEKAR, A. (2004). PCR-restriction fragment length analysis of aflR gene for differentiation and detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize. **International Journal of Food Microbiology** 93, 101-107.
- SOMMA, S., ALVAREZ, C., RICCI, V., FERRACANE, L., RITIENI, A., LOGRIECO, A. y MORETTI, A. (2010). Trichothecene and beauvericin mycotoxin production and genetic variability in *Fusarium poae* isolated from wheat kernels from northern Italy. **Food Additives and Contaminants** 27, 729-737.
- SOMMA, S., POSE, G., PARDO, A., MULÉ, G., FERNÁNDEZ, V., MORETTI, A. y LOGRIECO, A. (2011). AFLP variability, toxin production, and pathogenicity of *Alternaria* species from Argentinean tomato fruits and puree. **International Journal of Food Microbiology** 145, 414-419.
- SOMMER, N.F. (1985). Role of controlled environments in suppression of postharvest diseases. **Canadian Journal of Plant Pathology** 7, 331-339.
- SORENSEN, J.L., MOGENSEN, J.M., THRANE, U. y ANDERSEN, B. (2009). Potato carrot agar with manganese as an isolation medium for *Alternaria*, *Epicoccum* and *Phoma*. **International Journal of Food Microbiology** 130, 22-26.
- SORIANO, J.M. (2007). Micotoxinas en alimentos. Díaz de Santos (Ed.), Madrid, España.
- SPADARO, D., PATHARAJAN, S., KARTIKEYAN, M., LORÈ, A., GARIBALDI, A. y GULLINO, M.L.

- (2011). Specific PCR primers for the detection of isolates of *Aspergillus carbonarius* producing ochratoxin A on grapevine. **Annals of Microbiology** 61, 267-272.
- SREENIVASA, M.Y., GONZÁLEZ-JAÉN, M.T., SHARMILA, R., CHARITH, A.P. y JANARDHANA, G.R. (2008). A PCR-based assay for the detection and differentiation of potential fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* isolated from Indian maize kernels. **Food Biotechnology** 22, 160-170.
- STACK, M.E., MAZZOLA, E.P., PAGE, S.W., POHLAND, A.E., HIGHET, R.J., TEMPESTA, M.S. y CHORLEY, D.G. (1986). Mutagenic perylenequinones metabolites of *Alternaria alternata*: altertoxins I, II and III. **Journal of Natural Products** 49, 866-871.
- STACK, M.E., MISLIVEC, P.B., ROACH, J.A.G. y POHLAND, A.E. (1985). Liquid chromatographic determination of tenuazonic acid and alternariol methyl ether in tomatoes and tomato products. **Journal of AOAC International** 68, 640-642.
- STACK, M.E. y PRIVAL, M.J. (1986). Mutagenicity of the *Alternaria* metabolites altertoxins I, II, and III. **Applied and Environmental Microbiology** 4, 718-722.
- STEPIEN, L., GROMADZKA, K. y CHELKOWSKI, J. (2012). Polymorphism of mycotoxin biosynthetic genes among *Fusarium equiseti* isolates from Italy and Poland. **Journal of Applied Genetics** 53, 227-236.
- STINSON, E., OSMAN, S., HEISLER, E., SICILIANO, J. y BILLS, D. (1981). Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges and lemons. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 29, 790-792.
- SUANTHIE, Y., COUSIN, M.A. y WOLOSHUK, C.P. (2009). Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. **Journal of Stored Products Research** 45, 139-145.
- SULYOK, M., KRSKA, R. y SCHUHMACHER, R. (2007). A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 389, 1515-1523.
- SULYOK, M., KRSKA, R. y SCHUHMACHER, R. (2010). Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. **Food Chemistry** 119, 408-416.
- TAKIGAWA, T., WANG, B., SAKANO, N., WANG, D., OGINO, K. y KISHI, R. (2009). A longitudinal study of environmental risk factors for subjective symptoms associated with sick building syndrome in new dwellings. **Science of the Total Environment** 407, 5223-5228.
- TANAKA, A. y TSUGE, T. (2001). Reporter gene analysis of AKT3-1 and AKT3-2 expression during conidial germination of the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. **Journal of General Plant Pathology** 67, 15-22.
- TAYLOR, R.D., SAPARNO, A., BLACKWELL, B., ANOOP, V., GLEDDIE, S., TINKER, N.A. y HARRIS, L.J. (2008). Proteomic analyses of *Fusarium graminearum* grown under mycotoxin-inducing conditions. **Proteomics** 8, 2256-2265.
- TELETCHÉA, F., BERNILLON, J., DUFFRAISSE, M., LAUDET, V. y HÄNNI, C. (2008). Molecular identification of vertebrate species by oligonucleotide microarray in food and forensic samples. **Journal of Applied Ecology** 45, 967-975.
- TERMINIELLO, L., PATRIARCA, A., POSE, G. y FERNÁNDEZ, V. (2006). Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean tomato puree. **Mycotoxin Research** 22, 236-240.
- THOMMA, B. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. **Molecular Plant Pathology** 4, 225-236.
- TIMMER, L.W., GARNSEY, S.M. y GRAHAM, J.H. (2000). Compendium of citrus diseases, 2<sup>a</sup> ed. APS press (Ed.), St. Paul, Estados Unidos.
- TIMMER, L.W., PEEVER, T.L., SOLEL, Z. y KAZUYA, A. (2003). *Alternaria* diseases of citrus: Novel pathosystems. **Phytopathologia Mediterranea** 42, 99-112.

- TIMMER, L.W., SOLEL, Z., GOTTWALD, T.R., IBÁÑEZ, A.M. y ZITKO, S.E. (1998). Environmental factors affecting production, release, and field production of conidia of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of citrus. **Phytopathology** 88, 1218-1223.
- TOTHILL, I.E., HARRIS, D. y MAGAN, N. (1992). The relationship between fungal growth and ergosterol content of wheat grain. **Mycological Research** 96, 965-970.
- TREBSTEIN, A., SEEFELDER, W., LAUBER, U. y HUMPF, H.U. (2008). Determination of T-2 and HT-2 toxins in cereals including oats after immunoaffinity cleanup by liquid chromatography and fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56, 4968-4975.
- TURTON, N.J., JUDAH, D.J., RILEY, J., DAVIES, R., LIPSON, D., STYLES, J.A., SMITH, A.G. y GANT, T.W. (2001). Gene expression and amplification in breast carcinoma cells with intrinsic and acquired doxorubicin resistance. **Oncogene** 20, 1300-1306.
- TYMON, L.S. y JOHNSON, D.A. (2011). Prevalence and aggressiveness of *Alternaria solani* and *A. alternata* on potato in the Columbia Basin of the Pacific Northwest. **Phytopathology** 101, S180.
- TYLKOWSKA, K. (1992). Carrot seed-borne diseases caused by *Alternaria* species. En: *Alternaria: biology, plant diseases and metabolites*. Chelkowski, J. y Visconti, A. (Eds.). Amsterdam, Holanda.
- VAKALOUNAKIS, D.J. (1990). Host range of *Alternaria alternata* f. sp. *cucurbitae* causing leaf spot of cucumber. **Plant Disease** 74, 227-230.
- VEGI, A., SCHWARZ, P. y WOLF-HALL, C.E. (2011). Quantification of Tri5 gene, expression, and deoxynivalenol production during the malting of barley. **International Journal of Food Microbiology** 150, 150-156.
- VICENT, A., ARMENGOL, J., SALES, R. y GARCÍA-JIMENEZ, J. (2000). First report of *Alternaria* brown spot of citrus in Spain. **Plant Disease** 84, 1044.
- VIEIRA, R., VELOSO, J., AFONSO, A. y RODRIGUES A. (2006). Cutaneous alternariosis in a liver transplant recipient. **Revista Iberoamericana de Micología** 23, 107-109.
- VIJAY, H.M. y KURUPP, V.P. (2003). Fungal allergens. En: *Allergens and Allergen Immunotherapy*, 3ª ed. Lokey, R.F. y Bukantz, S.C. (Eds.). Nueva York, Estados Unidos.
- VOELKERDING, K.V., DAMES, S.A. y DURTSCHI, J.D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. **Clinical Chemistry** 55, 641-658.
- WANG, S., SIM, T.B., KIM, Y.S. y CHANG, Y.T. (2004). Tools for target identification and validation. **Current Opinion in Chemical Biology** 8, 371-377.
- WANG, J., WANG, X., ZHOU, Y., DU, L. y WANG, Q. (2010). Fumonisin detection and analysis of potential fumonisin-producing *Fusarium* spp. in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) in Zhejiang Province of China. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 90, 836-842.
- WATANABE, M. (2008). Production of mycotoxins by *Penicillium expansum* inoculated into apples. **Journal of Food Protection** 71, 1714-1719.
- WILHELM, J. y PINGOUD, A. (2003). Real-time polymerase chain reaction. **Chembiochem: a European journal of chemical biology** 4, 1120-1128.
- WILSON, I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology** 63, 3741-3751.
- XIE, L., ZHANG, J.Z., WAN, Y. y HU, D.W. (2010). Identification of *Colletotrichum* spp. isolated from strawberry in Zhejiang Province and Shanghai City, China. **Journal of Zhejiang University Science B** 11, 61-70.
- XU, L. y DU, L. (2006). Direct detection and quantification of *Alternaria alternata lycopersici* toxins using high-performance liquid chromatography-evaporative light-scattering detection. **Journal of Microbiological Methods** 64, 398-405.
- XU, D.S., KING, T.Q. y MA, J.Q. (1996). The inhibitory effect of extracts from *Fructus lycii* and *Rhizoma polygonati* on *in vitro* DNA breakage by alternariol. **Biomedical Environmental Sciences** 9, 67-70.
- YEKELER, H., BITMIS, K., OZCELIK, N., DOYMAZ, M.Z. y CALTA, M. (2001). Analysis of toxic effects

- of *Alternaria* toxins on oesophagus of mice by light and electron microscopy. **Toxicologic Pathology** 29, 492-497.
- YIN, Y., LIU, X. y MA, Z. (2009). Simultaneous detection of *Fusarium asiaticum* and *Fusarium graminearum* in wheat seeds using a real-time PCR method. **Letters in Applied Microbiology** 48, 680-686.
- YLI-MATTILA, T., WARD, T.J., O'DONNELL, K., PROCTOR, R.H., BURKIN, A.A., KONONENKO, G.P., GAVRILOVA, O.P., AOKI, T., MCCORMICK, S.P. y GAGKAEVA, T.Y. (2011). *Fusarium sibiricum* sp. nov, a novel type A trichothecene-producing *Fusarium* from northern Asia closely related to *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae*. **International Journal of Food Microbiology** 147, 58-68.
- YOUNG, A.B., DAVIS, N.D. y DIENER, U.L. (1980). The effect of temperature and moisture on tenuazonic acid production by *Alternaria tenuissima*. **Phytopathology** 70, 607-609.
- YU, W., YU, F.Y., UNDERSANDER, D.J. y CHU, F.S. (1999). Immunoassays of selected mycotoxins in hay, silage and mixed feed. **Food and Agricultural Immunology** 11, 307-319.
- ZHEN, Y.Z., XU, Y.M., LIU, G.T., MIAO, J., XING, Y.D., ZHENG, Q.L., MA, Y.F., SU, T., WANG, X.L., RUAN, L.R., TIAN, J.F., ZHOU, G. y YANG, S.L. (1991). Mutagenicity of *Alternaria alternata* and *Penicillium cyclopium* isolated from grains in an area of high incidence of oesophageal cancer - Linxian China. En: Relevance to human cancer of N-nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxins. O'Neill, I.K., Chen, J. y Bartsch, H. (Eds.). International Agency for Research on Cancer, Lyon, Francia.
- ZHOU, X.G. y EVERTS, K.L. (2008). First report of *Alternaria alternata* f. sp. *cucurbitae* causing *Alternaria* leaf spot of melon in the Mid-Atlantic region of the United States. **Plant Disease** 92, 652.
- ZINEDINE, A., JUAN, C., SORIANO, J.M., MOLTÓ, J.C., IDRISSE, L. y MAÑES, J. (2007). Limited survey for the occurrence of aflatoxins in cereals and poultry feeds from Rabat, Morocco. **International Journal of Food Microbiology** 115, 124-127.
- ZUR, G., HALLERMAN, E.M., SHARF, R. y KASHI, Y. (1999). Development of a polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Alternaria* fungal contamination in food products. **Journal of Food Protection** 62, 1191-1197.
- ZUR, G., SHIMONI, E., HALLERMAN, E. y KASHI, Y. (2002). Detection of *Alternaria* fungal contamination in cereal grains by a polymerase chain reaction-based assay. **Journal of Food Protection** 65, 1433-1440.

*CAPÍTULO VIII*  
*Glosario de Abreviaturas*

---





<b>ABC</b>	<i>ATP-binding Cassette</i>	<b>CAS</b>	<i>Chemical Abstracts Services</i>
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico	<b>CBS</b>	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
<b>ADNc</b>	Ácido Desoxirribonucleico Complementario	<b>cDNA</b>	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
<b>ADNr</b>	Ácido Desoxirribonucleico Ribosómico	<b>CE</b>	Comunidad Europea
<b>AFLP</b>	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados	<b>CECT</b>	Colección Española de Cultivos Tipo
<b>ALT</b>	<i>Altenue</i> Altenueno	<b>CFU</b>	<i>Colony-Forming Unit</i>
<b>AME</b>	<i>Alternariol Monomethyl Ether</i> Alternariol Monometil Éter	<b>C<sub>p</sub></b>	<i>Crossing point</i> Punto de corte
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of Variance</i> Análisis de la Varianza	<b>CSCF</b>	<i>Scientific Committee on Food of the Czech Republic</i> Comité Científico sobre Alimentos de la República Checa
<b>AOH</b>	<i>Alternariol</i> Alternariol	<b>C<sub>t</sub></b>	<i>Threshold cycle</i> Ciclo umbral
<b>APCI</b>	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> Ionización Química a Presión Atmosférica	<b>CV</b>	<i>Coefficient of Variation</i> Coeficiente de Variación
<b>APPC</b>	Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico	<b>DAD</b>	<i>Diode Array Detection</i> Detección con Array de Diodos
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico	<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<b>ARNm</b>	Ácido Ribonucleico Mensajero	<b>dNTP</b>	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i> Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>ARNr</b>	Ácido Ribonucleico Ribosómico	<b>DRYES</b>	<i>Dichloran Rose bengal Yeast Extract Sucrose Agar</i> Agar Sacarosa-Extracto de levadura-Rosa de bengala-Diclorán
<b>ATP</b>	<i>Adenosine triphosphate</i> Adenosín trifosfato	<b>E</b>	<i>Efficiency</i> Eficiencia
<b>ATX</b>	<i>Alt toxin</i> Alttoxina	<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> Ácido Etilendiaminetetraacético
<b>a<sub>w</sub></b>	<i>Water Activity</i> Actividad de Agua	<b>EFS</b>	Extracción en Fase Sólida
<b>BfR</b>	<i>Bundesinstitut für Risikobewertung</i> <i>German Federal Institute for Risk Assessment</i> Instituto Federal de Evaluación de Riesgos de Alemania	<b>EFSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i> Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	<b>EF-1α</b>	Gen codificador del factor de elongación 1α
<b>bp</b>	<i>base pair</i>	<b>EI</b>	<i>Electron Impact</i> Ionización Electrónica

<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	<b>ISO</b>	Espaciador Intergénico <i>International Organization for Standardization</i>
<b>ELL</b>	Extracción Líquido/Líquido		Organización Internacional para la Estandarización
<b>EMBL</b>	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>	<b>ITS</b>	<i>Internal Transcribed Spacer</i> Espaciador Interno de la Transcripción
<b>EMBOSS</b>	<i>European Molecular Biology Open Software Suite</i>	<b>IUIS</b>	<i>International Union of Immunological Societies</i> Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas
<b>ESI</b>	<i>Electrospray ionization</i> Ionización por Electrospray	<b>LC</b>	<i>Liquid Chromatography</i>
<b>FAB</b>	<i>Fast Atom Bombardment</i> Bombardeo Atómico Rápido	<b>LC-MS/MS</b>	Cromatografía Líquida con doble detector de espectrometría de masas
<b>FLD</b>	<i>Fluorescence Detection</i> Detección de fluorescencia	<b>MALDI</b>	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i> Desabsorción/Ionización Láser Asistida por Matriz
<b>FRET</b>	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente	<b>MARM</b>	Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
<b>GAP</b>	<i>Good Agricultural Practices</i> Buenas Prácticas Agrícolas	<b>MEA</b>	<i>Malt Extract Agar</i> Agar Extracto de Malta
<b>GC</b>	<i>Gas Chromatography</i>	<b>mRNA</b>	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
<b>GMP</b>	<i>Good Manufacturing Practices</i> Buenas Prácticas Industriales	<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i> Espectrometría de Masas
<b>gpd</b>	<i>gliceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	<b>mt SSU</b>	<i>Mitochondrial small subunit</i> Subunidad Mitocondrial Pequeña
<b>HACCP</b>	<i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i>	<b>MUCL</b>	<i>Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain</i>
<b>HLB</b>	<i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i> Equilibrio Hidrófilo-Lipófilo	<b>NCBI</b>	<i>National Centre for Biotechnology Information</i>
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> Cromatografía Líquida de Alta Resolución	<b>NPRS</b>	<i>Nonribosomal Peptide Synthetase</i> Péptido Sintetasa No Ribosomal
<b>HPLC-MS</b>	HPLC con detector de espectrometría de masas	<b>OMG</b>	Organismo Modificado Genéticamente
<b>HPLC-MS/MS</b>	HPLC con doble detector de espectrometría de masas	<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina E	<b>pb</b>	pares de bases
<b>IGS</b>	<i>Intergenic Spacer</i>	<b>PBS</b>	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>

<b>PCA</b>	<i>Potato Carrot Agar</i> Agar Patata Zanahoria		PCR con transcriptasa inversa
<b>PCA-c</b>	PCA con Cicloheximida	<b>Sabouraud-CAF</b>	Sabouraud- <i>Chloramphenicol</i> Sabouraud-Cloranfenicol
<b>PCA-Mn</b>	PCA con Manganeseo	<b>SBH</b>	<i>Sequencing by Hybridization</i> Secuenciación por Hibridación
<b>PDA</b>	<i>Potato Dextrose Agar</i> Agar Patata Dextrosa	<b>SD</b>	<i>Standard Deviation</i> Desviación Estándar
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> Reacción en Cadena de la Polimerasa	<b>SDS</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> Dodecil Sulfato Sódico
<b>PCR-RFLP</b>	<i>PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism</i> Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción de Regiones Amplificadas por PCR	<b>SEE</b>	Síndrome del Edificio Enfermo
<b>PFP</b>	<i>Pentafluorophenyl</i> Pentafluorofenilo	<b>SIDA</b>	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
<b>PI</b>	<i>Propidium Iodide</i>	<b>TAE</b>	<i>Tris-Acetate-EDTA</i>
<b>Pm</b>	Peso Molecular	<b>TeA</b>	<i>Tenuazonic Acid</i> Ácido Tenuazónico
<b>RAPD</b>	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> Polimorfismo del ADN Amplificado con Cebadores Arbitrarios	<b>TE</b>	<i>Tris-EDTA</i>
<b>rDNA</b>	<i>Ribosomal Deoxyribonucleic Acid</i>	<b>TEN</b>	<i>Tentoxin</i> Tentoxina
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i>	<b>TLC</b>	<i>Thin layer chromatography</i> Cromatografía en Capa Fina
<b>RP-HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución con columnas de Fase Inversa	<b>UE</b>	Unión Europea
<b>rRNA</b>	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>	<b>UFC</b>	Unidad Formadora de Colonias
<b>rpm</b>	<i>revolutions per minute</i>	<b>UniProt</b>	<i>Universal Protein Resource</i>
<b>RT-PCR</b>	<i>Reverse transcriptase PCR</i>	<b>UPLC-MS/MS</b>	Cromatografía líquida de ultra resolución con doble detector de espectrometría de masas
		<b>UV</b>	<i>Ultraviolet</i> Ultravioleta

